Aus dem Pathologischen Institut der Universität Erlangen
Direktor: Professor Dr. E. Kirch.

Über Beziehungen der Serotoxine zur Anaphylaxie

Serologische und pathologisch-anatomische Untersuchungen im Tierexperiment

Habilitationsschrift
einer
hohen medizinischen Fakultät
der
Bayrischen Friedrich-Alexanders-Universität in Erlangen
zur
Erlangung der venia legendi für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie
vorgelegt von

Dr. med. Julius Felix Buchaly
1. Assistent am pathologischen Institut

Aus dem Pathologischen Institut der Universität
Erlangen

Direktor: Professor Dr. E. Kirch

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

So umfangreich auch das bisherige Schrifttum über Anaphylaxie, Allergie, spezifische Überempfindlichkeit und ähnliche Begriffe ist, so sehr mangelt doch noch eine klare und allgemein anerkannte Definition hierüber. Es fehlt eben die notwendige Voraussetzung: eine genügend vertiefte Einsicht in das Wesen der Prozesse (Doerr [3]). Alle derartigen Versuche einer Definition und Klassifikation stellen lediglich hypothetisches Flickwerk dar. Da man also diese Begriffe nicht mit einer wohlumgrenzten Definition füllen kann, muß eine Beschreibung der Erscheinungsformen der gegenseitigen unvoreingenommenen Verständigung genügen. Demnach darf man als allergisch, anaphylaktisch, überempfindlich etc. alle die Formen des pathologischen Geschehens bezeichnen, die ziemlich gesetzmäßig dann eintreten, wenn artfremdes Eiweiß in einen für diese Eiweißart sensiblen Organismus zur Reaktion gelangt. Der Reaktionsablauf stellt nach der heute allgemein anerkannten Auffassung eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion in vivo dar. Die Reaktionsfolgen richten sich nach dem Ort des Ablaufes. Sie sind uns in der Hauptsache entweder als allgemeiner anaphylaktischer Schock oder als lokale anaphylaktische Entzündung bekannt.

Versuchsmäßig reproduzieren lassen sich anaphylaktische Erscheinungen am einfachsten beim genügend hoch aktiv oder passiv sensibilisierten Tier; das Versuchstier der Wahl ist das Meerschweinchen. Der allgemeine Schock tritt dann auf, wenn das reinjizierte Antigen verhältnismäßig rasch in den Säftestrom des Körpers gelangt. Er ist uns in zwei Formen, entweder als akuter oder als protahierter Schock bekannt. Welche von den beiden Formen des allgemeinen Schocks auftritt, richtet sich nach der Schnelligkeit der Resorption des Antigens, nach der reinjizierten Antigenmenge, sowie auch nach dem Sensibilisierungsgrad des Versuchstieres.

Den akuten Schock, der in wenigen Minuten zum Tode des Tieres führt, beobachtet man dementsprechend am regelmäßigsten beim hochsensibilisierten Meerschweinchen, dem das Antigen unmittelbar in die Blutbahn, entweder intravenös oder intrakardial, reinjiziert wird. Die klinischen Erscheinungen gipfeln in Erstickungssymptomen, auf die auch der Tod zurückzuführen ist. Bei der Sektion findet man in der Hauptsache Veränderungen an der Lunge, die als prall mit Luft gefüllte, steife Organe das Herz fast vollkommen überlagern. Unter bestimmten Umständen kann auch Lungenödem, eventuell

hämorrhagischen Charakters den Befund komplizieren. Die Lungenblähung ist Folge eines Krampfes der Bronchialmuskulatur. (Im histologischen Bilde sieht man das Lumen der großen Bronchien weitgehend verengt.) Der Bronchialkrampf ist also der wesentlichste Faktor des akuten anaphylaktischen Schocks. Als akuten rudimentären Schock bezeichnet Doerr (3) einen Symptomenkomplex, der aus Respirationskrämpfen, motorischer Unruhe und Abgang von Stuhl und Urin besteht, vom Tier aber nach kurzer Zeit überstanden wird. Er kann dann auftreten, wenn die intravenös zugeführte Antigenmenge relativ klein ist.

Der protrahierte Schock hält Minuten bis Stunden an, er kann den Tod des Tieres nach langer Zeit zur Folge haben, braucht es aber nicht. Respiratorische Krämpfe treten bei ihm zurück. Im Vordergrund der klinischen Erscheinungen stehen komatöse Zustände und vor allen Dingen Temperatursturz und Blutdrucksenkung. Bei der Sektion findet man weniger häufig Lungenblähung, dagegen ist ein Lungenödem, zum Teil mit Hämorrhagien, ein vielerhobener Befund. Im Ganzen kann man feststellen, daß beim protrahierten Schock die klinischen Erscheinungen und der Sektionsbefund weniger pathognomonische Anhaltspunkte für einen anaphylaktischen Zustand geben als beim akuten Schock.

Diesen Formen des allgemeinen Schocks kann man als zweite Art experimenteller anaphylaktischer Erscheinungen den lokalen Gewebsschock gegenüberstellen, der eine bestimmte Form der Entzündung darstellt. Er ist als „Arthus'sches Phänomen", bzw. als „Hyperergische Entzündung" (Rößle [30]) bekannt und tritt dann ein, wenn mit der Reinjektion des Antigens beim sensibilisierten Tier ein Antigendepot gesetzt wird. Diese von dem Franzosen Arthus im Jahre 1904 zuerst an der Haut des sensibilisierten Kaninchens beobachtete Entzündung wurde von Rößle (30) und Gerlach (14) bestätigt und an der Haut verschiedener Tierarten, wie auch am Menschen festgestellt. Klinge (18) reproduzierte sie an Gelenken und brachte sie theoretisch mit dem Rheumatismusproblem in Zusammenhang. Roulet (32) konnte sie auch an der Pleura erzeugen. Ihre morphologischen Merkmale sind insbesondere durch die Untersuchungen Rößles und Gerlachs gekennzeichnet worden. Darnach handelt es sich nicht um eine spezifische Entzündung mit Auftreten bestimmter pathognomonischer geweblicher Formelemente, wie man z. B. Epitheloidzellen und Langhans'sche Riesenzellen vorwiegend bei der Tuberkulose beobachtet, vielmehr beruhen die Unterscheidungsmerkmale gegenüber der einfachen Entzündung auf graduellen Unterschieden hinsichtlich der Intensität und des zeitlichen Ablaufes der Erscheinungen. Zusammenfassend formuliert Gerlach (15): „Während beim normergischen Tier auf eine subkutane Injektion eines Antigens eine geringe resorptive Entzündung eintritt, kommt es beim hochsensibilisierten Tier bei der Injektion gleicher Serummengen zu einer unmittelbar nach der Injektion be-

ginnenden stürmisch verlaufenden Reaktion mit Ödem, Stase, Verquellung der Bindegewebsfasern, Ischämie, Nekrose, Eiterung und Fibringausscheidung, sowie zu sehr bald einsetzenden Reparationsvorgängen. Im Ganzen tritt also eine mächtige Entzündung von exsudativ-hämorrhagischem Charakter in dem anaphylaktischen Reaktionsherd auf, die in kürzester Zeit zur Isolierung des Herdes führt, der demarkiert und abgestoßen wird." Der auffällig frühzeitige Beginn einerseits, die Intensität des Verlaufes, sowie das frühe Einsetzen reparativer Vorgänge erweisen sich also als Charakteristika der hyperergischen Entzündung gegenüber der Entzündung beim nichtsensibilisierten Tier auf den gleichen Reiz hin.

Die morphologischen Erscheinungen des allgemeinen Schocks und der lokalen anaphylaktischen Entzündung erscheinen somit festgelegt.

Erklärt werden die Veränderungen mit einer im Körper ablaufenden Antigen-Antikörper-Reaktion. Worin aber das Wesen der Reaktion besteht, ist auch durch morphologische Untersuchungen noch keineswegs geklärt. Stellt im Falle des Allgemeinschoks die Einengung des Bronchiallumens durch Spasmus der Bronchialmuskulatur die sinnfälligste Veränderung dar, so ist es bei der lokalen Anaphylaxie eine intensive Entzündung, die auf den Ablauf einer Antigen-Antikörper-Reaktion hindeutet. Die äußeren Erscheinungen des Ablaufes dieser Reaktion sind also je nach dem Applikationsmodus des reinjizierten Antigens weitgehend verschieden. Dabei muß es nach unseren heutigen Kenntnissen offen bleiben, ob die Folgen der Antigen-Antikörper-Reaktion ganz allgemein, direkte primäre Einwirkungen auf die Zellen darstellen, oder ob erst sekundäre Veränderungen, die beim Ablauf der Antigen-Antikörper-Reaktion im Körper auftreten, das Ausschlaggebende für die erkennbaren Störungen sind. Die Noxe selbst ist also unbekannt, man hat nur Anhaltspunkte für die Angriffspunkte bzw. Folgen der Noxe und muß Zellreizungen bzw. Zellschädigungen annehmen.

Bezüglich des Mechanismus dieser Zelleinwirkungen lassen sich mit Doerr (3) alle bisher aufgestellten Theorien auf zwei grundsätzlich verschiedene Anschauungen zurückführen. Entweder werden chemische bzw. fermentative Prozesse als eigentliche Noxe verantwortlich gemacht, oder aber die Antigen-Antikörper-Reaktion wird als ein Ablauf physikalischer Veränderungen aufgefaßt, die eine Zellreizung bzw. -Schädigung zur Folge haben sollen.

Bei den chemischen Einwirkungen spielt der Gedanke, daß ein konkretes Gift gebildet wird, die Hauptrolle, und zwar denkt man in erster Linie an das Auftreten von Eiweißabbauprodukten, da die Antigen-Antikörper-Reaktion mit einer parenteralen Eiweißverdauung einhergehen soll. Besonders verlockend war dieser Gedanke, da ja die Antigene parenteral zugeführte, fremdartigwirkende Eiweißkörper darstellen. Tatsächlich lassen sich auch mit Eiweißabbauprodukten, z. B. Wittepepton und besonders mit dem Histamin zum mindesten

schockähnliche Vorgänge und der anaphylaktischen Entzündung nahestehende Veränderungen auslösen. Auf die Entzündungen durch Injektion von Histaminlösung in die Subcutis des Menschen ist Lang (19) in einer sehr genauen Untersuchung erst kürzlich eingegangen; er konnte aber doch Unterschiede gegenüber der echten anaphylaktischen Entzündung feststellen. Ganz allgemein kann man zu den chemischen Theorien sagen, daß der Nachweis eines konkreten Zellgiftes, mit dem man zwanglos alle anaphylaktischen Erscheinungen reproduzieren kann, aus dem Blut von Schocktieren noch nicht erbracht ist. Es erscheint daher zum mindesten verfrüht, einen chemischen Prozeß als sicheren ausschlaggebenden Faktor für die bei der Antigen-Antikörper-Reaktion auftretenden Schädigungen anzugeben.

Auch die physikalischen Theorien haben uns eine restlose Klärung nicht bringen können. In erster Linie geht man hier von der Vorstellung „kolloidaler Umstimmungen" innerhalb der Zelle oder im Blut selbst aus. Durch die Antigen-Antikörper-Reaktion sollen „Flockungen der Plasmaproteine" (Erschütterungen des kolloidalen Gleichgewichtes) hervorgerufen werden (zitiert nach Doerr [3]). Weiterhin werden Ladungsänderungen der Plasmakolloide, Störungen der Oberflächenspannung, Verschiebungen der Viskosität u. s. f. in den Kreis der Erwägungen miteinbezogen. Weiter als zu Spekulationen ist man hier aber noch nicht gekommen; ein einwandfreier Beweis für alle Behauptungen steht noch aus. Während z. B. Dale (2), der am isolierten blutfreien virginellen Uterus des Meerschweinchens unter bestimmter Versuchsanordnung anaphylaktische Kontraktionen erzielen konnte, den Ablauf der Reaktion in das Innere der Zelle selbst verlegte und von einer Störung der Lösungsbedingungen der Kolloide spricht, verlegt Doerr (3) die Reaktionswirkung in seiner „Membranhypothese" in die Außenschichten der Zellen. Hier an den Grenzflächen sollen sich alle die Vorgänge, die man zusammenfassend mit kolloidaler Umstimmung bezeichnen kann, abspielen. Er wird mit dieser Auffassung den bisher anerkannten und gesicherten Tatsachen des ganzen Problems der Anaphylaxie wohl am meisten gerecht. Doerr (3) betont aber, daß seine Hypothese keine Aussage über den Mechanismus der Zellschädigungen selbst enthält; er will in erster Linie die Annahme eines besonderen anaphylaktischen Giftes überflüssig machen. Diese Membranhypothese ist eine prinzipiell zelluläre Theorie; sie steht im Gegensatz zu den rein humoralen Theorien, die alle physikalischen Veränderungen in das Blut des injizierten Tieres verlegen. Bei der Antigen-Antikörper-Reaktion soll es auf dem Boden kolloidaler Umstimmungen der Blutflüssigkeit zu einer „Blutgiftung" kommen, die den allgemeinen anaphylaktischen Schock herbeiführt. Wie alle Theorien über den Mechanismus der Antigen-Antikörper-Reaktion bleiben auch diese humoralen physikalischen Anschauungen letzten Endes auf Spekulationen beschränkt.

Bei diesen Erscheinungen der „Blutgiftung" scheinen mir aber nicht alle Möglichkeiten des Versuches erschöpft, und ich hielt es daher für angebracht, vom pathologisch anatomischen Standpunkt aus im Tierversuch den Beziehungen dieser Blutgiftung zum Anaphylaxieproblem nachzugehen.

Was zunächst ganz kurz das Historische dieser Forschungen anbetrifft, so glaubte man anfangs noch eventuell faßbare chemische Gifte erzeugt zu haben und sprach von „Anaphylatoxinen". Diese Arbeitshypothese geht auf Friedemann (11) und ganz besonders auf Friedberger (9) zurück.

Friedemann (11) injizierte normalen Kaninchen ein arteigenes frisches Blutserum, das kurze Zeit mit Erythrocyten untermischt wurde, die mit Ambozeptor beladen waren. Die Erythrocyten waren dann abzentrifugiert worden, bevor noch eine Lösung eingetreten war; das Tier reagierte mit Schocksymptomen.

Friedberger (9) stellte einen ähnlichen Versuch mit Präzipitatserum beim Meerschweinchen an und konnte akuten letalen Schock auslösen. Beide Autoren nahmen daraufhin an, daß ein mit Antikörpern beladenes Eiweißantigen durch Hinzutritt von Komplement des Normaltieres fermentativ abgebaut würde und die dabei entstehenden Eiweißabbauprodukte den Schock auslösen würden. Diese Stoffe hielten sie für die bei der Anaphylaxie ausschlaggebenden Gifte und nannten sie daher Anaphylatoxine. Schon bald nach Veröffentlichung dieser Versuche mußten jedoch Zweifel an der Richtigkeit der Deutung auftreten; insbesondere konnte nachgewiesen werden, daß der Ablauf einer Antigen-Antikörper-Reaktion gar nicht nötig war, um gleichartige Schockerscheinungen beim Normaltier zu erzeugen. Es gelang nämlich auch, mit antikörperfreien Stoffen Anaphylatoxine zu gewinnen. Weiterhin können auch Eiweißabbauprodukte keine Rolle spielen, denn gleiche Veränderungen des Blutserums mit gleicher Wirkung auf das Normaltier ließen sich erzielen, wenn das Serum lediglich mit Agar (Bordet) oder mit Polysacchariden, z. B. Stärke oder Innulin, vorbehandelt wurde (Nathan [23 und 24]).

Den großen Streit, der sich daraufhin in der serologischen Literatur zwischen Friedberger und seiner Schule, die beharrlich bei der Annahme von Eiweißabbauprodukten verblieb, und den Gegnern abspielte, darf man bei einer Zusammenfassung übergehen. Ein kritischer Überblick über die gesamte Literatur drängt jedenfalls zu der Auffassung, daß es keine Eiweißabbauprodukte, sondern lediglich kolloidale Umstimmungen des Blutserums selbst sein können, welche die Blutgiftung hervorrufen. Tatsache ist jedenfalls, daß man mit derartig vorbehandelten Seren Schocksymptome beim Normaltier auslösen kann; Tatsache ist weiterhin, daß durch die verschiedenartigsten Vorbehandlungen das Blutserum eines Normaltieres zu einer derartigen Wirkung gebracht werden kann. Um durch

die Nomenklatur daher nichts zu präjudizieren, hat Doerr (3) den Namen „Anaphylatoxine" abgelehnt und die Bezeichnung „Serotoxine" inauguriert; da dieser Begriff in der vorliegenden Arbeit im Mittelpunkt der Untersuchungen und Erörterungen steht, sei die Definition Doerrs besonders hervorgehoben; er versteht unter Serotoxinen:

„Blutsera, welche durch den gewöhnlichen Gerinnungsprozeß aus Vollblut abgeschieden wurden und durch die Berührung mit verschiedenen Kontaktsubstanzen eine vorher nicht vorhandene schockauslösende Wirkung erworben haben."

Als Kontaktsubstanzen kommen belebtes Eiweiß (pathogene und apathogene Mikroorganismen), sowie unbelebtes Eiweiß (Serum anderer Tierarten, gekochtes Hühnereiweiß etc.), weiterhin Eiweißabbauprodukte (Peptone), außerdem auch eiweißfreie Substanzen wie Pararabin (gereinigter Agar), Inulin, Stärke und auch anorganische Substanzen (Kaolin) in Frage. Mit allen diesen Substanzen läßt sich eine Blutgiftung erzielen. Diese Vielfältigkeit der Mittel deutet schon darauf hin, daß die vielen Kontaktsubstanzen selbst nicht die Träger einer Giftbildung sein können, die gleiche (spezifische) Wirkungen auslöst. Es hat sogar den Anschein, als ob die Kontaktsubstanzen überhaupt nicht notwendig wären, um eine Giftbildung zu veranlassen; denn Schütteln des Serums bis zum Eintritt von Trübung und auch sonstige einfache physikalische Eingriffe können das Serum im gleichen Sinne giftig machen. (Dold [5]). Alles das weist daraufhin, daß wohl keine rein chemischen Prozesse bei der Blutgiftung in Frage kommen, sondern phsykalische Umsetzungen. Darauf ist weiterhin auch die Tatsache zu beziehen, daß z. B. Cholera-vibrionen Serotoxin erzeugen, Choleragranula (nach Vibriolyse) aber dazu nicht in der Lage sind; weiterhin, daß Inulin suspension eine Blutgiftung veranlaßt, dagegen eine Innulinlösung das gleiche nicht vermag. (Nathan [25].) Auch für Agar ist der jeweilige Zustand ausschlaggebend, so geben Novy und de Kruif (29) als ein gewisses Optumum einen „Solgel"-Zustand an. Beim Kontakt scheinen also irgendwelche korpuskulären Elemente von gewisser Größe, die vielleicht nicht einmal von außen zugeführt werden müssen, von Ausschlag zu sein, um die Umstimmung eintreten zu lassen. Wesentlich ist weiterhin, daß nur frisches, d. h. aktives Blutserum sich giftig umwandeln läßt. Inaktives, d. h. eine Stunde auf 56 Grad erhitztes Serum, ergibt keine Giftigkeit trotz entsprechender Vorbehandlung.

Aus alledem geht hervor, daß es berechtigt ist, von vornherein das Problem der Serotoxine heute den physikalisch-humoralen Theorien der Anaphylaxie zuzurechnen. Von vornherein dagegen die Serotoxine vom Problem der Anaphylaxie auszuschalten, weil ihnen als wesentlichstes Merkmal die Spezifität einer Antigen-Antikörper-Reaktion fehlt, erscheint mir nicht geboten, solange wir die Grundlagen des Mechanismus des echten anaphylaktischen Schockes, bzw.

der lokalen anaphylaktischen Entzündung nicht kennen. Davon sind wir aber noch weit entfernt und es dürfte daher berechtigt sein, in Experimenten alles aufzugreifen, was Aussicht hat, uns der Erkenntnis der Vorgänge beim anaphylaktischen Schock näher zu führen.

Ich hatte es mir daher zur Aufgabe gestellt, die durch Serotoxine erzeugte lokale Entzündung in der Haut von Versuchstieren (Meerschweinchen) makroskopisch und mikroskopisch daraufhin zu prüfen, ob die bekannten Kriterien der lokalen anaphylaktischen hyperergischen Entzündung auf diese Entzündungserscheinungen anzuwenden sind.

Daß man mit Serotoxinen überhaupt Entzündungen auslösen kann, ist bekannt. Als erster berichtet Friedberger (10) davon, allerdings nur im Rahmen einer Diskussion. Weiterhin fand ich Entzündungserscheinungen bei Moro und Tomono (22) angegeben, sowie bei Dold und Rados (8). Letztere Autoren experimentierten am Auge des Kaninchens. Nirgends dagegen konnte ich in der mir zugänglichen Literatur systematische Vergleichsuntersuchungen mit der hyperergischen Entzündung finden, insbesondere liegen noch keine Angaben über mikroskopische Untersuchungen der durch Serotoxine erzeugten lokalen Entzündungserscheinungen vor.

Methodik.

Die Methodik habe ich den jeweiligen Vorschriften angepaßt, welche die Autoren in ihren Veröffentlichungen gaben. Ich experimentierte einstweilen nur am Meerschweinchen als Serumspender, wie auch Versuchstier für die intravenösen und die kutanen lokalen Versuche. Es wurde also mit homologem Serum gearbeitet. Die Wahl des Meerschweinchens als Versuchstier erfolgte deshalb, weil es nach den Erfahrungen der Autoren Friedberger (l. c.), Nathan (l. c.), Novy und de Kruif (l. c.) am regelmäßigsten Schocksymptome nach intravenösen Injektionen von Serotoxinen gezeigt hat. Verwendbar sind aber auch Kaninchen.

Im ganzen setzte sich eine Versuchsreihe aus 6 verschiedenen Einzelversuchen zusammen, und zwar:

1. aus der sterilen Blutentnahme,
2. aus der Giftung des Serums zum „Serotoxin",
3. aus der Sterilitätskontrolle,
4. aus dem intravenösen Vorversuch zur Prüfung, ob eine Blutgiftung eingetreten ist,
5. aus dem kutanen Versuch mit verschiedenen Kontrollen,
6. aus der histologischen Untersuchung der Hautabschnitte.

ad 1) Die Blutentnahme geschah unter sterilen Kautelen. Das Haar am Halse des Tieres wurde mit Depilatorium „Unna" entfernt; dann wurde die enthaarte Haut und ihre Umgebung gründlich mit Alkohol desinfiziert und darauf mit sterilem Instrumenten das Tier aus den Halsgefäßen einer Seite (um nicht die unsterile Trachea zu eröffnen) in ein steriles Gefäß (Kolben mit Trichter oder Petrischale) entblutet. Zur Serumgewinnung wurden meist Meerschweinchen von 400—500 gr. verwendet, manchmal auch das Blut von Tieren, die im kutanen Versuch gestanden hatten, niemals dagegen von Tieren, die bereits eine intravenöse Injektion von Serotoxinen überdauert hatten, weil feststeht, daß derartige Tiere gegen weitere Einspritzungen refraktär sind. Diese Spendertiere obduzierte ich außerdem noch, um die Gewißheit zu haben, daß nur das Blut von Tieren zur Verwendung kam, die frei von irgendwelchen Krankheiten waren. Da man von einem Meerschweinchen durch Gerinnung des Blutes meist nur 6—8 ccm

Serum erhält, mußte in der Regel mit einem Mischserum von mehreren Tieren gearbeitet werden, um die notwendige Menge von Serum für die intravenösen und lokalen Versuche zu gewinnen. Um eine höhere Ausbeute von Serum aus dem Blut zu erhalten, wurde die nach der Gerinnung über dem Blutkuchen stehende Flüssigkeit möglichst vollständig abgegossen bzw. abpipettiert, mitgerissene Blutkörperchen wurden durch Zentrifugieren entfernt.

ad 2) Die Methodik der Blutgiftung ist in den Versuchsprotokollen mit allen Einzelheiten aufgeführt. Ganz allgemein kann hier schon gesagt werden, daß das durch Blutgerinnung gewonnene Serum in zwei Portionen geteilt wurde, von denen die eine Portion durch halbstündiges Erwärmen auf 56 Grad inaktiviert wurde. Beide Portionen, also das aktive und inaktive Serum wurden darauf mit der gleichen Kontaktsubstanz versetzt und je nach Vorschrift oder eigener Versuchsanordnung digeriert. Dann zentrifugierte ich zur Entfernung der Kontaktsubstanzen beide Serumportionen genau eine halbe Stunde.

ad 3) Die notwendigen Sterilitätskontrollen wurden stets mittels des Kulturverfahrens durchgeführt. Es wurde auf Keimfreiheit geprüft zunächst das unbehandelte aktive und inaktive Serum, die Kontaktsubstanz, sowie das aktive und inaktive Serum nach der Digerierung vor dem Zentrifugieren. Dabei wurden Bouillonröhrchen mit mehreren Ösen, oder auch mit 0,1—0,2 ccm Substanz, wenn mehr Material zur Verfügung stand, beschickt und nach 24 Stunden von dieser Bouillon auf Agarplatten ausgestrichen. Im allgemeinen ergaben die Sterilitätskontrollen kein Wachstum von Mikroorganismen. Ich möchte aber nicht behaupten, daß deswegen die Seren absolut keimfrei waren.

Es läßt sich mit dieser Art von Sterilitätskontrollen mit Sicherheit auch nur eine gröbere Verunreinigung mit vermehrungsfähigen Mikroorganismen ausschließen. Sicher hat auch die Bakterieidie des frischen Serums die festgestellte Sterilität unterstützt. Keineswegs genügt aber der Hinweis sterilen Arbeitens allein, wie man ihn häufig in der pathologisch-anatomischen Literatur findet (Geißendörfer [13]). Die verschiedenen Methoden der Schnittfärbung auf Mikroorganismen können keinesfalls das Kulturverfahren ersetzen, da sie von noch größeren Zufälligkeiten abhängig sind, als die oben angeführten Sterilitätsprüfungen. Ich glaubte daher auf derartige histologische Methoden verzichten zu können.

ad 4) Der intravenöse Versuch zur Feststellung und Auswertung der eingetretenen Blutgiftung wurden an Meerschweinchen

mit einem Gewicht von 200—300 gr. durchführt. Die Gewichte sind jeweils in den Protokollen angegeben. Das Tier wurde manchmal nach kurzem Annarkotisieren mit Äther (Einbringen des Tieres für etwa 15—30 Sekunden in ein geschlossenes Glasgefäß mit Ätherwattbausch) auf das von Doerr angegebene Meerschweinchenoperationsbrett fixiert, sodann die rechte Halsseite geschoren und mit Alkohol gründlich desinfiziert. Mit sertilen Instrumenten wurde darauf die rechte Vena jugularis interna freigelegt und die im Versuchsprotokoll angegebene Menge von vorbehandeltem Serum inzijiert.

Von einer Umschlingung der Vene mit einem Haltefaden wurde nach einigen Versuchen Abstand genommen, sondern lediglich die Vene durch Anziehen mit einer chirurgischen Pinzette zur Injektion fixiert. Dabei wurde darauf geachtet, daß auch nicht die Venenwand selbst, sondern nur das umgebende Gewebe von den Haken der Pinzette gefaßt wurde; es stellte sich nämlich heraus, daß die Injektion nur dann mit Leichtigkeit gelingt, wenn die Vene ihre physiologische Blutfüllung behält. Dazu darf sie bei der Vorbereitung nur möglichst wenig mechanischen Einflüssen ausgesetzt sein. Die Umschlingungen mit einem Faden, auch schon mehrfaches Berühren mit Instrumenten löst häufig eine Kontraktion aus. Man erkennt dann die Vene nur noch als winzigen Strang, an dem eine intravenöse Injektion nur sehr schwierig durchzuführen ist. Trotzdem muß man aber die Vene gut freilegen, um mühelos injizieren zu können. Das gelingt auch stets leicht ohne Kontraktion der Venenwand, wenn man darauf achtet, nur das umgebende Gewebe, nicht die Vene selbst mit der Pinzette anzugreifen.

Die Injektion des Serums erfolgte ziemlich langsam (etwa eine halbe bis dreiviertel Minute für 3—5 ccm), auch nach vollendeter Injektion hielt ich die Kanüle noch einige Zeit im Venenlumen, um sicher zu sein, daß die gesamte injizierte Serummenge in den Kreislauf abgeflossen war. Zur Blutstillung war eine Unterbindung der Vena jugularis nicht immer notwendig; wenn überhaupt eine Blutung eintrat, wurde die Injektionsstelle selbst von einer ziemlich breiten Klemme gefaßt. Meist war durch diese Kompression eine Blutstillung schon nach etwa einer halben Minute erreicht, so daß der Hautschnitt mit Klammern verschlossen werden konnte. Zur Feststellung der etwa auftretenden Krämpfe wurde das Tier möglichst bald aus der Zwangshaltung durch Lösen der Fuß- und Kopffesseln befreit.

ad 5) Der lokale Versuch wurde stets an der enthaarten Bauch- bzw. Brusthaut des Meerschweinchens durchgeführt. Die Enthaa-

rung geschah mit dem von Unna angegebenen „Depilatorium", das schon von Lerche (20) als mildestes Enthaarungsmittel bezeichnet wird. Im Gegensatz zu Gerlach (14) konnte ich mich durch Vorversuche davon überzeugen, daß beim vorsichtigen Rasieren der Haut doch, wenigstens beim Meerschweinchen, zelluläre Reaktionen auftraten (siehe mein Vorversuchsprotokoll). Auch beim Menschen konnte ich die gleiche Beobachtung machen; man sieht nämlich im Operationsmaterial, das nach Rasieren der entsprechenden Hautstelle gewonnen wurde, ebenfalls zelluläre Reaktionen der Cutis. Allerdings stehen mir bisher nur einzelne, nicht aber systematische Vergleichsuntersuchungen mit nicht rasierter Haut vom gleichen Individuum zur Verfügung.

Auch der lokale kutane Versuch wurde stets mit aktivem und inaktivem mit Kontaktsubstanz vorbehandeltem Serum durchgeführt; weiterhin wurde meist zur Kontrolle eine gleichzeitige Injektion von aktivem und inaktivem unbehandeltem Serum vorgenommen, sowie auch eine Injektion der jeweils verwendeten Kontaktsubstanz. Bei der Injektion selbst führte ich nach einigen Vorversuchen keine reine intrakutane Injektion aus, da hierfür die Meerschweinchenhaut, wenigstens des jungen Meerschweinchens von 200—300 gr. zu dünn und daher ungeeignet ist. Es gelingt trotz Anwendung dünnster und kurzgeschliffener Kanülen nicht mit Sicherheit, eine genügende Menge Injektionsflüssigkeit rein intrakutan zu injizieren. Stets wird auch etwas Flüssigkeit nach außen abfließen oder in die Subkutis eindringen. Ich ging daher bei der Injektion in der Weise vor, daß ich die Kanüle zunächst in das subkutane Gewebe brachte und dann von unten her das Corium mit der Kanülenspitze anging. Auf diese Weise gelang es mir stets, eine kleine Quaddel zu erzeugen; weiterhin gelangte auch etwas Injektionsflüssigkeit in die Subkutis. Der Einfachheit halber bezeichnete ich in meinen Versuchsprotokollen diese Versuchsart als „kutane" Injektion. Die Einstichstelle der Kanüle in die Subkutis war bei diesem Injektionsmodus stets weit genug von der Injektionsstelle selbst entfernt, um ein Abfließen von injizierter Flüssigkeit nach außen zu verhindern. Ich injizierte zur Vermeidung stärkerer mechanischer Reize nur 0,1 bzw. 0,2 ccm mit dünnen Kanülen von stets gleichem Kaliber. Daß beim Experimentieren mit so kleinen Injektionsmengen peinlichst darauf gesehen werden muß, daß Spritze und Kanüle keine Luftblasen enthalten, ist selbstverständlich. Man muß sich aber auch darüber klar sein, daß trotzdem die injizierten Mengen nie quantitativ absolut gleich sind. Sofort nach der Injektion wurde die Impfstelle mit einem Dermographen bezeichnet, und zwar umrandete ich zunächst die Quaddelgrenzen und darauf noch

einen Bezirk von 2—2½ qcm. Um vor Verwechslungen auch bei der Verarbeitung sicher zu sein, umgrenzte ich die Stellen mit aktivem Serum mit blauen, die Stellen mit inaktivem Serum mit rotem Farbstift.

ad 6 Der histologischen Untersuchung führte ich diese umgrenzten Hautpartien zu. Das Tier wurde vorher durch Nackenschlag betäubt und dann entblutet. Anfänglich am lebenden Tier ausgeführte kleinere Excisionen der Impfstelle erwiesen sich mir als ungenügend zur Beurteilung der entzündlichen Reaktionen und ihrer Ausdehnung. Wie schon Gerlach (14) berichtet, ist es mitunter schwer, die Stelle der Reinjektion wieder zu finden, zumal stärkere, makroskopisch wahrnehmbare Rötungen bei meinen Versuchen nicht auftraten. Gute Anhaltspunkte für die Verschiedenheit der Verteilung der injizierten Flüssigkeit in der Cutis bzw. Subkutis erhält man mit kutanen Tuscheinjektionen, wie sie auch von P. W. Schmitt (36) angegeben und abgebildet worden sind. Die jeweiligen Spannungsverhältnisse der Haut scheinen für die Ausbreitung des Injektionsgutes eine Rolle zu spielen. So ist die Spannung sicher davon abhängig, wie stark die Bauchdecken des Tieres von den Bauchorganen beansprucht sind, z. B. vom Darm. Aus diesem Grunde vermied ich die Verwendung schwangerer Tiere, zumal auch bei schwangeren Tieren eine Anschwellung der Mammae ebenfalls Veränderungen der Hautspannungen ergeben kann. Um möglichst an der Impfstelle die topographischen Verhältnisse, wie sie beim lebenden Tiere vorliegen, zu wahren, bin ich so vorgegangen, daß ich bei der Sektion zunächst die gesamte vordere und gesamte seitliche Brust- und Bauchwand ausgeschnitten und auf einem harten Filtrierpapier aufgespannt habe, eventuell unter Fixierung der Oberhaut mit Stecknadeln. Erst nach erfolgter Härtung in Formalin umschnitt ich die Injektionsstellen ziemlich breit, jedenfalls stets an der äußeren Umrandung. Die Fixierung erfolgte in isotonischer Kochsalz-Formalinlösung, meist 24 Stunden lang. Das Material wurde anfangs erst nach Einbettung in histologische Schnitte zerlegt, und zwar wählte ich zunächst die langwierige und zeitraubende Zelloidineinbettung, um möglichst lebenswahre histologische Bilder zu erhalten. Mußte ich doch besonderes Augenmerk auf etwaige ödematöse Durchtränkung des Gewebes besonders der Bindegewebsfasern achten und gerade dabei können Gewebsschrumpfungen durch die Art der Einbettung störend wirken. Um Erfahrung über die Ausbreitung des Reaktionsherdes zu gewinnen, folgte ich der Versuchsanordnung von Lang (19) und zerlegte die einzelnen Stücke in Serienschnitte. Den jeweils 50zigsten Schnitt unterwarf ich

der histologischen Untersuchung. Dabei konnte ich verschiedene und ungleiche Ausbreitung der Reaktionsherde feststellen, die wohl wieder, zum Teil wenigstens, in Zusammenhang zu bringen ist mit der verschiedenartigen Ausbreitung der injizierten Flüssigkeit, bzw. der aus dieser austretenden entzündungserregenden Stoffe. Einige Versuche konnte ich aus diesem Grunde nicht verwerten, weil die Reaktionen in den Randpartien der Schnitte lagen, und ich daher annehmen mußte, daß die stärksten Reaktionsherde im Präparat nicht getroffen wären. Serienschnitte, zum wenigsten aber Stufenschnitte halte ich bei allen derartigen Arbeiten für unumgänglich notwendig, wenn man keinen Täuschungen unterliegen will. Als mir ein Gefriermikrotom mit der Messertiefkühlvorrichtung nach Schultz-Brauns zur Verfügung stand (37), und ich mir schon durch die Zelloidineinbettung Erfahrung gesammelt hatte, ging ich so vor, daß ich die Gegend der vermuteten stärksten Reaktion nach Fixierung gefrierschnitt und den Vorschriften von Schultz-Brauns entsprechend weiter verarbeitete. Zur Kontrolle dieser Befunde war es wieder notwendig, nach Einbettung das Material in Stufenschnitte weiter zu untersuchen. Dazu wählte ich dann am liebsten die Paraffinmethode, doch läßt sich auch die Gelatineeinbettung verwerten, die auch mehrfach angewandt wurde.

Zur Färbung der Schnittpräparate benutzte ich die Hämalaun-Eosin-Färbung neben den Elektivfärbungen für Fett- und Bindegewebe. In Zweifelsfällen leistete mir auch die Oxydasereaktion gute Dienste, die ich natürlich nur an Gefrierschnitten ausführte.

Versuche.

Vorversuch A.

Zur Klärung der Frage, ob Rasieren der Haut oder die Enthaarung mit einem Depilierungsmittel für die Versuche empfehlenswert sei, war folgender Versuch notwendig.

Je ein Meerschwein wurde an der Haut der einen Bauchseite nach Einseifen rasiert bzw. depiliert (mit Depilatorium „Unna") und dann nach 24 Stunden ebenso mit der anderen Hautseite verfahren und gleich darauf das Tier getötet. Makroskopisch waren beim Rasieren einige Schorfe zu erkennen; auch an der depilierten Haut war Epitheldefekte nachweisbar.

Die histologische Untersuchung wurde an den vier Hauptstellen in Gefrierschnitten durchgeführt und es ergab sich:

Rasierte Haut: Die unmittelbar vor der Tötung rasierte Haut zeigte eine Anrauhung der oberflächlichen Hornschichten; zum Teil fehlten die Hornlamellen vollkommen und es waren an einigen Stellen auch tiefere Epidermisschichten mit entfernt. In der Umgebung derartiger Partien fanden sich kleinere Blutungen im Bindegewebe. Doch sah man auch Hämorrhagien an Stellen, wo die Epidermis weniger stark verletzt war. Kleinzellige Infiltrate waren vorhanden und zwar erkannte man außer Histiocyten und Lymphocyten auch wenige polymorphkernige, Oxydase positive Leukocyten im Gewebe eingestreut.

Es hatte also eine Emigration von polymorphkernigen Leukocyten aus den Gefäßen in das Gewebe stattgefunden.

In der Hautstelle, die 24 Stunden vor der Entnahme rasiert war, waren tiefere Epitheldefekte nicht mehr nachzuweisen. Wohl erkannte man noch einige Blutungen und auffälligerweise waren die Infiltrate etwas vermehrt. Auch polymorphkernige Leukocyten waren unter diesen Infiltraten erkennbar.

Die kurz vor der Tötung des Tieres depilierte Haut zeigt keine stärkeren Verletzungen des Epithels, insbesondere waren die Hornschichten überall erhalten. Sie färbten sich stellenweise, besonders in den oberen Schichten etwas stärker mit Hämetoxylin. Auch in diesem Gewebsstück sah man kleinzellige Infiltration und unter den Infiltraten wiederum polymorphkernige Leukocyten.

Die 24 Stunden vorher depilierte Haut zeigte im Wesentlichen den gleichen Befund. Jedoch waren hier die Infiltrate weniger deutlich und reichlich als bei dem ersten depilierten Hautstück, und sicher auch infiltratärmer, als bei der Haut, die 24 Stunden vorher rasiert war.

Nach diesen Vorversuchen wählte ich daher zur Enthaarung das Depilatorium „Unna" in vorsichtiger, d. h. möglichst kurzer Einwirkung auf die Haut.

Versuchsreihe I

(mit Agar nach Bordet-Nathan).

1 gr. Agar wurde in 200 ccm physiologischer Kochsalzlösung während 15 Stunden aufgequollen, dann im Autoklaven bei 110 Grad sterilisiert und im Dampftopf filtriert. Es bildete sich eine bei Zimmertemperatur gallertige Agarmasse.

Von dem sterilen Serum eines Meerschweinchens von ca. 500 gr. wurde eine Hälfte inaktiviert. Je 4 ccm aktives und inaktives Serum wurden nach Erwärmen auf 37 Grad mit je 1 ccm Agargallerte von ebenfalls 37 Grad versetzt, kräftig durchgeschüttelt, und nach $3^1/_4$-stündigem Digerieren im Brutschrank (37 Grad) genau eine halbe Stunde zentrifugiert. (In dem Zentrifugenglas des aktiven Serums sah man in der Kuppe eine opaleszierende Abscheidung, die etwas festere Konsistenz hatte. Das Röhrchen mit inaktivem Serum wies diese Erscheinungen nicht auf.)

Alle Kulturen zur Sterilitätskontrolle blieben steril.

Intravenöser Versuch:

Meerschweinchen 250 gr. Nach Injektion von 3.5 ccm aktivem „Agarserums"' trat starkes krampfartiges Atmen unter ruckartigem Einziehen der Flanken bei der Inspiration auf. Das Tier zitterte; das Fell war gesträubt. Der Zustand dauerte etwa 5 Minuten, darauf folgte allmähliche Erholung.

Meerschweinchen ca. 250 gr. Nach Injektion von 3.5 ccm inaktiven „Agarserums" war ein Atemstillstand von etwa 5 Sekunden festzustellen, darauf setzte gleichmäßige, ziemlich oberflächliche Atmung wieder ein.

Lokaler Versuch:

Meerschweinchen 250 gr. in die 5 Stunden vorher enthaarte Brust- bzw. Bauchhaut wurde kutan injiziert:

1. 0,2 ccm „Agarserum" aktiv;
2. 0,2 ccm „Agarserum" inaktiv;
3. 0,2 ccm Serum aktiv (unbehandelt vom gleichen Spendertier);
4. 0,2 ccm Serum inaktiv (unbehandelt vom gleichen Spendertier);
5. 0,2 ccm Agarstammlösung.

Makroskopischer Befund:

Nach 30 Minuten und nach 2 Stunden war eine Rötung oder Schwellung der Haut nicht feststellbar.

Nach 24 Stunden (kurz vor der Tötung): An den Injektionsstellen selbst ließen sich ziemlich umschriebene Verhärtungen durchtasten, besonders deutlich bei 5. Rötung oder stärkere ödematöse Schwellung, wie auch Nekrotisierungen der Epidermis waren nicht erkennbar.

Histologische Untersuchung:

I_1). Die Epidermis weist keine besonders breite Hornschicht auf. Im Ganzen ist das Epithel unverletzt; nur an der Injektionsstelle findet man einen kleinen Schorf, von dem Einstiche herrührend, der aus eingedicktem Serum besteht, das in den tieferen Schichten gering von Leukocyten durchsetzt wird. Die Anhangsgebilde der Haut zeigen keine wesentlichen Veränderungen; Haare sind allerdings nur noch vereinzelt in den Haarbälgen erkennbar. Das subepidermale Bindegewebe weist eine ganz geringe Einlagerung von Leukocyten auf. In der Subkutis findet sich eine stärkere entzündliche Infiltration, die in Gegend der Impfstelle (etwa in der Mitte des Präparates) stärker ist als in den Randpartien. In der Mitte erscheinen die Infiltrate und Gewebszüge auch mehr gelockert, während man in den Randpartien die Entzündungszellen zwischen den Bindegewebsfasern reihenförmig eingepreßt findet. In der Hauptsache bestehen die Infiltrate aus polymorphkernigen Leukocyten. Lymphocyten finden sich nur ganz spärlich; sichere Plasmazellen sind nirgends zu erkennen. Stellenweise sind die Bindegewebszellen etwas vermehrt, besonders die periadventiellen Zellen erscheinen vermehrt und im Ganzen gebläht. Die Gefäße selbst sind mäßig weit; sie enthalten meist Blut mit etwas Leukocytose. Thromben sind nicht nachweisbar. Eine Aufquellung der Bindegewebsfasern findet sich nirgends, auch sieht man nichts von Nekrosen. Die quergestreifte Muskulatur ist erhalten. Es findet sich deutliche Querstreifung. In den Muskelinterstitien erkennt man an der Stelle der stärksten Infiltration eine Vermehrung der perivaskulären Zellen, auch liegen hier einige polymorphkernige Leukocyten.

I_2). Im wesentlichen ist das gleiche Bild wie bei I_1 zu sehen. Auch hier liegt die stärkste Infiltration an der Stelle der Injektion, etwa in der Mitte des Präparates; jedoch hat man hier den Eindruck, als ob die Infiltrate etwas mehr aufgelockert und etwas reichlicher vorhanden wären als bei I_1. Doch ist der Unterschied nicht deutlich. Eine Verquellung der Bindegewebsfasern und Nekrosen sind auch in den vorliegenden Serienschnitten nicht feststellbar.

I_3). Auch in den Serienschnitten der mit unbehandeltem aktiven Serum injizierten Haut findet sich eine deutlich leukocytäre Infiltration, die aber im Ganzen geringer und weniger ausgedehnt ist, als in den Präparaten von I_1 und $_2$. Die Lockerung des Gewebes in

der Mitte an der Injektionsstelle ist weniger ausgeprägt. Die Infiltrate liegen überall reihenförmig wie in den Randpartien der Schnitte I_1 und $_2$. Als Nebenbefund sind kleinere Hämorrhagien in den Randpartien und in den Interstitien der Muskulatur feststellbar. Stellenweise zeigen die Interstitien etwas stärkere Infiltration als in dem vorhergehenden Präparat. (Offenbar ist bei der Injektion die oberste Muskelschicht angestochen worden.)

I.$_4$). Auch hier findet sich Infiltration, die sicher stärker ist als bei I_3. In ihrer Ausdehnung entspricht sie annähernd der Infiltrationsstärke von I_1; jedoch ist hier die Lockerung des Gewebes überall ausgeprägter.

I.$_5$). Vom injizierten Agardepot sieht man noch einige ziemlich homogene Stellen, in deren Umgebung sich mäßig reichliche polymorphkernige Leukocyten, die ziemlich dicht beieinander liegen, finden. Auch im Agar selbst liegen Leukocyten. Während nach der einen Seite die Infiltrate ziemlich unvermittelt, ohne Ausläufer, abschließen, sieht man an der anderen Seite zu eine allmähliche Verjüngung des Infiltratsaumes. Die Infiltration reicht also sicher über die eigentliche Injektionsstelle hinaus. Wiederum bestehen die Infiltrate in der Hauptsache aus polymorphkernigen Leukocyten. Lymphocyten und Bindegewebselemente sind nur vereinzelt erkennbar. Weiterhin sieht man einige fleckförmige Blutungen. Eine wesentliche ödematöse Lockerung findet sich nicht, auch keine Verquellung des Bindegewebes und keine Nekrosen.

Resultate von Versuchsreihe I.

Intravenöser Versuch: Im aktiven Serum hat sich bei Kontakt mit Agar Serotoxin gebildet; während das mit gleichartig vorbehandeltem inaktivem Serum injizierte Tier keine wesentlichen Erscheinungen zeigte, waren bei dem mit aktivem „Agarserum" gespritzten Tier deutliche krampfartige Erscheinungen auszulösen.

Lokaler Versuch: Aktives und inaktives „Agarserum" sind entzündungserregend. Die Entzündungserscheinungen zeigen nichts spezifisches, insbesondere sind sie nicht identisch mit der hyperergischen Entzündung des Meerschweinchens. Wesentliche Unterschiede zwischen der Entzündung nach Injektion von aktivem und der von inaktivem „Agarserum" bestehen nicht.

Kontrollversuche: Aktives und inaktives unbehandeltes Serum lösen ebenfalls in der Cutis eine deutliche leukocytäre Reaktion aus. In vorliegendem Falle ist die Reaktion nach Injektion von inaktivem Serum stärker.

Die Agarstammlösung veranlaßt ebenfalls leukocytäre Reaktion.

Versuchsreihe II

(mit Inulinsuspension nach Nathan).

10 g Inulin wurden in sterilem Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 190 ccm steriler Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Nach

kurzem Schütteln ergab sich eine grauweiße undurchsichtige Suspension. Eine wesentliche Klärung der Flüssigkeit trat auch nach stunden- und tagelangem Stehen nicht ein; lediglich bildete sich ein geringer Bodensatz.

Zu je 4 ccm aktiven und inaktiven sterilen Serums eines Meerschweinchens von ca. 500 g wurde je 1 ccm Inulin-Suspension gemischt, $3^1/_4$ Stunden im Brutschrank bei 37 Grad digeriert und darauf $^1/_2$ Stunde zentrifugiert. Der Bodensatz war sowohl im aktiven als auch im inaktiven Serum annähernd gleich stark.

Alle Kulturen zur Sterilitätskontrolle blieben steril.

Intravenöser Versuch:

Meerschweinchen 220 g. Nach Injektion von 3,5 ccm aktiven „Inulinsuspensions-Serum" trat stark forcierte Atmung mit deutlichem Flankenziehen auf, das etwa 3 Minuten anhielt. (Die Erscheinungen waren nicht ganz so ausgeprägt, wie nach der Injektion von aktivem „Agarserum".) Es erfolgte ziemlich schnelle Erholung.

Meerschweinchen ca. 220 g. Nach Injektion von 3,5 ccm inaktiven „Inulinsuspensions-Serums" atmete das Tier ohne wesentliche Unterbrechung ruhig weiter.

Lokaler Versuch:

Meerschweinchen ca. 250 g. In die 5 Stunden vorher depilierte Brust- und Bauchhaut wurde kutan injiziert:

1. 0,2 ccm „Inulinsuspension-Serum" aktiv;
2. 0,2 ccm „Inulinsuspension-Serum" inaktiv;
3. 0,2 ccm Serum aktiv (unbehandelt vom gleichen Spendertier);
4. 0,2 ccm Serum inaktiv (dt.);
5. 0,2 ccm Inulinsuspension-Stammlösung.

Makroskopischer Befund:

Nach 30 Minuten und 2 Stunden war eine wesentliche Rötung oder Schwellung der Haut nirgends feststellbar. Nach 24 Stunden (kurz vor der Tötung): eine stärkere Verhärtung und geringe Schwellung ist lediglich bei II_5 feststellbar; Rötung sieht man aber auch hier nicht. An den übrigen Injektionsstellen findet sich nur eine geringe, meist linsengroße Verhärtung.

Histologische Untersuchung:

In allen Präparaten ist eine mäßig starke Leukocytendurchsetzung des subepidermalen Bindegewebes auffällig; das Epithel der Epidermis ist nur noch als schmaler, keine Verhornung aufweisender Streifen erhalten.

$II._1$). Der entzündliche Prozeß in der Subkutis hat ziemlich große Ausdehnung. In allen Serienschnitten, auch in den aus den Randpartien finden sich Infiltrate, am stärksten wieder an der Stelle der Injektion, in der Mitte des Präparates. Es fällt auf, daß das Ge-

webe im Ganzen stärker gelockert ist, sicher stärker als in I_1. Dementsprechend liegen die Infiltrate nicht reihenförmig zwischen den Bindegewebszügen, sondern diffus verstreut. Deutliche ödematöse Durchsetzung ist besonders in der Mitte an der Injektionsstelle vorhanden; die Bindegewebsfasern selbst sind nicht wesentlich durch Quellung verdickt. Auch in den obersten Muskelinterstitien ist Infiltration feststellbar. In der Hauptsache bestehen die Infiltrate wieder aus polymorphkernigen Leukocyten; Lymphocyten sind nur spärlich erkennbar. Weiterhin sieht man einige größere Zellen mit exzentrischem Kern, die man wohl als Plasmazellen deuten kann. Die Adventitiazellen erscheinen nur wenig gebläht und vermehrt. Beim Durchmustern der Serienschnitte fallen an zwei Stellen etwa in der Mitte des Präparates Anhäufungen von Leukocyten auf; man kann hier schon von kleinen Abszessen sprechen. Ausgedehntere Nekrosen finden sich aber nicht. Die Gefäse sind ziemlich weit. Sie enthalten meist Blut mit Leukocytose.

II.$_2$). Die Entzündung hat sich mehr außerhalb der umzeichneten Injektionsstelle entwickelt. Trotzdem ist der Befund aber noch zu verwerten, da die Präparate II_2 und II_4 aus nebeneinanderliegenden Hauptstücken stammen, und sich somit das histologische Bild aus beiden Präparatenserien ergänzen läßt. Danach kann man feststellen, daß im wesentlichen der gleiche Befund vorliegt, wie bei II_1. Auch hier ist ziemlich deutliche Lockerung des Gewebes mit Einlagerung von Infiltraten zu erkennen, die vorwiegend aus Leukocyten bestehen. Deutliche Abszeßbildung wird aber hier nicht beobachtet, doch liegen hier die Infiltrate stellenweise recht dicht.

II.$_3$). In diesen Präparaten findet sich ebenfalls entzündliche Infiltration, die nicht so stark ist, wie in den Schnitten von II_1 und $_2$. Es ist aber in den Präparaten die relativ starke ödematöse Durchsetzung auffällig, die in den einzelnen Abschnitten der Serie in ihrer Stärke wechselt. Die Bindegewebsfasern sind auch hier nicht wesentlich verquollen. Nekrosen finden sich nicht. Die Infiltration besteht in der Hauptsache aus polymorphkernigen Leukocyten.

II.$_4$). Die in den Randpartien der einen Seite liegenden Infiltrate von ziemlicher Stärke gehören zur Injektion II_2. Weiterhin findet sich davon entfernt ein nicht so ausgedehnter Infiltratherd, der der Lokalisation nach als Reaktion auf die Injektion von inaktivem unbehandeltem Serum aufzufassen ist. Die Infiltrate liegen hier ziemlich dicht beieinander. Ödematöse Lockerung ist im Gegensatz zu II_3 nur gering feststellbar. Dagegen fällt auf, daß das über diesem Infiltratherd liegende Bindegewebe, das weniger zellreich durchsetzt ist, eine geringe Lockerung durch Ödem aufweist.

II.$_5$). War an dieser Stelle schon makroskopisch eine stärkere Reaktion an der Impfstelle gegenüber den anderen Injektionsreaktionen zu erkennen, so ist auch histologisch hier weitaus die stärkste Entzündung nachweisbar. Es findet sich eine deutliche ödematöse Lockerung und starke zellige Durchsetzung des kutanen bzw. sub-

kutanen Bindegewebes. Auch die obersten Muskelinterstitien weisen vermehrten Zellgehalt auf. An der Injektionsstelle selbst findet sich eine abszeßartige Anhäufung von Leukocyten. Lymphocyten sind nur vereinzelt erkennbar. Es finden sich auch einige Plasmazellen. In den seitlichen Partien nehmen die Infiltrate allmählich an Stärke ab.

Resultate von Versuchsreihe II.

Intravenöser Versuch: Im aktiven Serum hat sich nach Kontakt mit Inulinsuspension Serotoxin gebildet: deutlich krampfartige Erscheinungen waren bei Impfung direkt in die Blutbahn auszulösen. Das inaktivierte mit Inulin-Suspension vorbehandelte Serum wurde ohne Störung bei intravenöser Injektion vertragen.

Lokaler Versuch: Aktives und inaktives „Inulinsuspensions-Serum" lösen Entzündungserscheinungen aus, die im Ganzen stärker sind als nach lokaler Injektion von gleichartig vorbehandeltem „Agar-Serum". Ein wesentlicher Unterschied der Entzündungserscheinungen nach Injektion von aktivem und nach Injektion von inaktivem „Inulinsuspensions-Serum" ist nicht festzustellen.

Kontrollversuch: Die mit unbehandeltem aktivem Serum des gleichen Spendertieres auszulösenden Entzündungserscheinungen weisen ziemlich starke Infiltration und etwas auffällige Ödembildung auf. Die Injektion von inaktivem Serum hat auch Infiltration zur Folge, die ziemlich dicht, aber weniger ödematös aufgelockert erscheint.

Mit 5% Inulinsuspension waren die stärksten Entzündungserscheinungen mit breiten Anhäufungen von Leukocyten und deutlicher Ödembildung zu erzielen.

Versuchsreihe III

(mit Inulinlösung nach Nathan).

Von der Inulinsuspension des Versuchs II wurden 10 ccm in einem sterilen Reagensglas über dem Bunsenbrenner erwärmt; es trat bald eine vollkommene Klärung der Inulinaufschwemmung ein, die auch nach dem Erkalten bestehen blieb. Die Suspension war also unter dem Einfluß der Erwärmung in eine Lösung übergegangen.

Von dieser Inulinlösung wurde je 1 ccm mit je 4 ccm sterilem aktiven bzw. inaktiven Serum eines Meerschweinchens von ca. 500 g versetzt und nach ca. 3¼stündigem Digerieren 2 Stunden zentrifugiert. Es bildete sich kein Bodensatz.

Alle Kulturen zur Sterilitätsprüfung blieben steril.

Intravenöser Versuch:

Meerschweinchen 230 g. Nach Injektion von 3,5 ccm aktiven „Inulinlösung-Serums" erkennt man lediglich eine etwas beschleunigte Atmung, die aber durchaus oberflächlich bleibt und nach ca. 2 Minuten in die gehörige langsame Atmung überging.

Meerschweinchen 220 g. Nach Injektion von 3,5 ccm inaktiven „Inulinlösung-Serums" geht die Atmung ohne Unterbrechung langsam und gleichmäßig weiter.

Lokaler Versuch:

Meerschweinchen ca. 240 g. In die 5 Stunden vorher depilierte Brust- und Bauchhaut wurde kutan injiziert:

1. 0,2 ccm „Inulinlösung-Serum" aktiv;
2. 0,2 ccm „Inulinlösung-Serum" inaktiv;
3. 0,2 ccm Serum aktiv (unbehandelt vom gleichen Spendertier);
4. 0,2 ccm Serum inaktiv (unbehandelt vom gleichen Spendertier);
5. 0,2 ccm Inulinlösung (Stammlösung).

Makroskopischer Befund:

Nach $^1/_2$ Stunde und nach 2 Stunden war eine Rötung und Schwellung an den Injektionsstellen nicht nachzuweisen. Nach 24 Stunden (kurz vor der Tötung): An den Injektionsstellen bestehen geringe Verhärtungen, die kaum tastbar sind. Rötungen oder Nekrosen sind nicht vorhanden.

Histologische Untersuchung:

III.$_1$). Es findet sich lediglich ein schmaler Infiltratsaum, bestehend aus polymorphkernigen Leukocyten und wenig Lymphocyten. Der Saum liegt der obersten Muskelfascie als schmaler Streifen, der sich nach den seitlichen Partien hin verjüngt, auf. Das kutane Bindegewebe zeigt keine wesentliche ödematöse Lockerung oder Zellvermehrung.

III.$_2$). Im wesentlichen der gleiche Befund wie bei III$_1$.

III.$_3$). Auch hier sind Infiltrate an der Injektionsstelle nachweisbar. Sie erscheinen mehr gelockert und weniger streifenförmig als bei III$_1$ und $_2$. Doch handelt es sich in den vorliegenden Präparaten offenbar um Schnitte, die nicht ganz senkrecht zur Hautoberfläche getroffen wurden. Jedenfalls ist eine deutliche ödematöse Durchtränkung des Gewebes nicht zu erkennen. Auch die Zahl der infiltrierenden Zellen ist geringer als bei III$_1$ und $_2$.

III.$_4$). Es sind ebenfalls Infiltrate vorwiegend aus Leukocyten zu erkennen. Ödematöse Lockerung ist nicht feststellbar. Die Zahl der Infiltratzellen ist etwa die gleiche wie bei III$_3$.

III.$_5$). Es findet sich nur eine schmale und wenig ausgedehnte Infiltratzone, vorwiegend aus polymorphkernigen Leukocyten bestehend; keine Ödembildung.

Resultate von Versuchsreihe III.

Mit Inulinlösung ist weder aktives noch inaktives Serum so zu verändern, daß bei intravenöser Injektion Krämpfe ausgelöst werden können.

Lokaler Versuch: An den Injektionsstellen mit aktivem und inaktivem „Inulinlösung-Serum" ist entzündliche Infiltration feststell-

bar, die aber nicht besonders ausgedehnt ist. Ödematöse Durchtränkung wurde nicht hervorgerufen. Zwischen aktivem und inaktivem „Inulinlösung-Serum" bestehen keine Unterschiede in der entzündungsauslösenden Wirkung.

Kontrollversuch: Das aktive Serum hat im vorliegenden Falle eine deutliche Infiltration hervorgerufen, die auch mit geringer ödematöser Lockerung einhergeht. Das inaktive Serum zeigt die gleichen Erscheinungen, vielleicht in vorliegendem Falle in Ausdehnung etwas weniger stark als das aktive Serum.

Die Inulinlösung selbst ruft auch eine entzündliche Infiltration hervor, die bei weitem nicht die Stärke der Entzündung nach Injektion von Inulinsuspension erreicht.

War in den 3 ersten Versuchen das Serum in stets gleich langen Zeiträumen ($3^1/_4$ Stunde) digeriert worden, so wurde im nächsten Versuch IV eine Digerierungsdauer von 21 Stunden gewählt; auch benutzte ich nicht das Serum nur eines Spendertiers, sondern ein Mischserum von mehreren kleineren Meerschweinchen.

Versuchsreihe IV.

Die für den lokalen Versuch verwendeten Meerschweinchen I, II und III wurden steril in einen sterilen Kolben entblutet, vom abgesetzten Serum eine Hälfte inaktiviert und dann je 4 ccm aktiven bzw. inaktiven Serums mit je 1 ccm der unter Versuch I angegebenen Agargallerte versetzt und bei Brutschranktemperatur von 37 Grad insgesamt 21 Stunden digeriert. Nach halbstündigem Zentrifugieren bildete sich beim aktiven „Agarserum" wieder ein opaleszierender Bodensatz; das inaktive „Agarserum" wies keinerlei Abscheidungen nach dem Zentrifugieren auf, doch war nach dem Erkalten das Material in der Zentrifugenglaskuppe gering gallertig, aber nicht trüb oder opaleszierend.

Alle Kulturen zur Sterilitätskontrolle blieben steril.

Intravenöser Versuch:

Meerschweinchen 240 g. Nach Injektion von 3,5 ccm „Agarserum" trat ziemlich starke krampfartige Atmung auf, die erst nach 3 Minuten allmählich in normale flachere Atemtätigkeit übergeht. Das Tier starb nach etwa 12 Stunden.

Meerschweinchen ca. 230 g. Nach Injektion von ca. 3 ccm inaktiven „Agarserums" war die Atmung lediglich gering beschleunigt, aber ohne besondere Forcierung; das Tier blieb am Leben.

Lokaler Versuch:

Meerschweinchen 250 g. In die 24 Stunden vorher depilierte Bauch- bzw. Brusthaut wurden injiziert:

1. 0,2 ccm „Agarserum" aktiv;
2. 0,2 ccm „Agarserum" inaktiv;
3. 0,2 ccm Serum aktiv (unbehandelt vom gleichen Mischserum).

Makroskopischer Befund:

Nach einer halben Stunde und nach 2 Stunden war eine Rötung oder ödematöse Schwellung an den Injektionsstellen nicht zu erkennen.

Nach 24 Stunden (kurz vor der Tötung) fanden sich lediglich geringe, kaum tastbare Infiltrationen an den Impfstellen.

Histologischer Befund:

IV.$_1$). Es findet sich ein Infitrationsstreifen von polymorphkernigen Leukocyten, der nicht besonders breit ist. In der Mitte des Präparates sind die Infiltrate etwas aufgelockert, mehr diffus verteilt; in den Randpartien liegen sie meist reihenförmig zwischen den Bindegewebsfasern. Hier sieht man auch stellenweise breite Lymphgefäße, sowie prall gefüllte Venen. Eine ödematöse Verquellung des Bindegewebes sowie Nekrosen sind nicht feststellbar.

IV.$_2$). An der Impfstelle selbst liegen die Leukocyten etwas fleckig gehäuft. In den Randpartien sind sie wiederum streifig und reihenförmig angeordnet. Im übrigen ist der gleiche Befund wie bei $_1$ zu erheben.

IV.$_3$). Hier findet sich ein mäßig umschriebener Herd von Infiltraten ohne weitere Ausläufer in die Umgebung. Die Infiltration wird in der Hauptsache von Leukocyten gebildet, sie sind etwa ebenso reichlich nachweisbar wie an der Impfstelle bei IV$_1$.

Resultat von Versuchsreihe IV.

Die längere Digerierungsdauer und die Benutzung von Mischserum hat keinen Einfluß auf den Ausfall des intravenösen Versuchs. Der Schock blieb beim aktiven Serum im vorliegenden Fall auch rudimentär. Auch im lokalen Versuch waren keine stärkeren Entzündungserscheinungen auszulösen.

Kontrollversuch:

Das Mischserum zeigt keine anderen Entzündungserscheinungen als das Serum einzelner Tiere.

Der Versuch IV hat im wesentlichen die gleichen Resultate ergeben wie der Versuch I. Es wurde daher die Vorbehandlung des Serums abgeändert und nach den Vorschriften von Novy und de Kruif (29) gearbeitet, die mit ihrem „Agar-Solgel", die sichersten positiven Resultate im intravenösen Versuch erzielt haben.

Versuchsreihe V

(mit Agar nach Novy und de Kruif):

Von dem Mischserum von 5 Meerschweinchen von 250—450 g wurden 2 Portionen von je 5 ccm entnommen und davon die eine inaktiviert. Beide Serumportionen sowie der vorher 2 Stunden im Dampftopf gehaltene 5% Agar von Versuch I wurden auf 37 Grad

im Brutschrank erwärmt, bzw. bis zu 37 Grad abgekühlt. Die Substanzen wurden daher etwa 4 Stunden im Brutschrank gehalten. Die Prüfung der Temperatur geschah nicht mit dem Thermometer, sondern dem Gefühl nach mit der Hand, um die Sterilität nicht zu gefährden. Darauf wurden die beiden Serumportionen mit je 0,25 ccm Agar versetzt und 1 Minute mit der Hand kräftig geschüttelt. Sodann wurden beide Serumröhrchen in einem Gefäß mit Eisbröckeln genau 3 Stunden abgekühlt und darauf 30 Minuten zentrifugiert. Wiederum zeigte sich im Röhrchen mit aktivem „Agarserum" ein opaleszierendes Zentrifugat, während d · inaktive „Agarserum" keinen Bodensatz irgendwelcher Art aufwies.

Alle Kulturen zur Sterilitätskontrolle blieben steril.

Intravenöser Versuch:

Meerschweinchen 300 g. Nach Injektion von 4 ccm aktiven „Agarserums" zeigte das Tier ziemlich starkes forciertes Atmen, das etwa 2 Minuten anhielt, bald darauf trat Erholung ein.

Meerschweinchen 280 g. Nach Injektion von 4 ccm inaktiven „Agarserums" ging die Atmung gleichmäßig ohne Unterbrechung weiter.

Lokaler Versuch:

Meerschweinchen 240 g. In 24 Stunden vorher delipierte Brust- bzw. Bauchhaut wurden injiziert:

1. 0.2 ccm „Agarserum" aktiv;
2. 0,2 ccm „Agarserum" inaktiv;
3. 0,2 ccm „Agarserum" aktiv Zentrifugat.

Da der intravenöse Versuch wieder nur einen rudimentären Schock ergeben hatte, konnte mit den gleichen Entzündungserscheinungen nach 24 Stunden gerechnet werden. Es wurde daher diesesmal die Versuchsdauer des Lokalversuches auf 40 Stunden festgesetzt, um zeitlich bedingte Unterschiede festzustellen. Weiterrhin wurde ein lokaler Versuch mit dem auffälligen opaleszierenden Zentrifugat des aktiven „Agarserums" vorgenommen.

Makroskopischer Befund:

Nach einer halben und 2 Stunden war keine wesentliche Rötung und Schwellung an der Impfstelle zu erkennen, auch nicht bei V_3. Nach 12. 24 und 36 Stunden war an den Injektionsstellen jeweils eine kleine Verhärtung zu spüren, die am schwächsten bei V_2, etwas stärker bei V_1 und am deutlichsten bei V_3 aufgetreten war. Rötung, Schwellung oder gar Nekrose war aber auch bei V_3 nicht zu erkennen. Tötung nach 40 Stunden.

Histologischer Befund:

V_1). Es läßt sich der gleiche Befund erkennen wie bei V_2: Man erkennt ein nicht besonders breit entwickeltes Infiltratpolster im

subkutanen Bindegewebe, der Muskulatur aufliegend. An der Impfstelle selbst liegen die Zellen etwas diffuser, stellenweise fleckförmig gehäuft. In der Hauptsache handelt es sich um polymorphkernige Leukocyten (Oxydase-Reaktion positiv). Eine Quellung der Bindegewebsfasern ist nicht erkennbar, desgleichen sieht man nichts von Nekrose.

V.$_3$). Hier ist das Infiltratpolster breiter und ausgedehnter als in den Präparaten $_1$ und $_2$. Die Zellen liegen viel diffuser, stellenweise etwas fleckig angehäuft. Während nach der einen Seite zu das Polster kurz abschließt, ist nach der anderen Seite zu ein schmaler Infiltratsaum als Ausläufer erkennbar. Ödematöse Lockerung des Gewebes ist vorhanden, eine ödematöse Quellung der Bindegewebsfasern selbst aber nicht festzustellen. Die Venen sind weit und enthalten Blut. Nekrosen finden sich nirgends.

Resultate von Versuchsreihe V.

Auch nach der Vorbehandlung des Serums mit Agar nach der Vorschrift von Novy und de Kruif tritt in der vorliegenden Versuchsreihe keine stärkere Reaktion sowohl beim intravenösen, als auch beim lokalen Versuch auf. Bei einer Versuchsdauer von 40 Stunden erscheinen beim lokalen Versuch die Infiltrate etwas mehr auf die Impfstellen selbst begrenzt. Das umgebende Gewebe zeigt weniger reichliche Zellen. Das Zellbild ändert sich aber nicht wesentlich.

Das opaleszierende Zentrifugat des aktiven „Agarserums" löst im Kutanversuch ebenfalls Entzündungserscheinungen aus, die stärker sind als nach Injektion von aktivem und inaktivem „Agarserum". Die charakteristischen Zeichen der hyperergischen Entzündung sind aber nach Injektion dieses Materials nicht zu erhalten.

War bisher nur mit unbelebten Kontaktsubstanzen gearbeitet worden, so erforderte die Vollständigkeit, auch mit Mikroorganismen gleichartig zu experimentieren. Allerdings konnten diese nur im abgetöteten Zustand verwendet werden, da die lokalen Versuche absolute Sterilität zur Voraussetzung haben.

Versuchsreihe VI.

Von dem gleichen Serumgemisch, das auch zum Versuch V benutzt wurde, teilte ich zwei Portionen von je 3,5 ccm ab und inaktivierte die eine. Darauf wurden beide Portionen mit einer Abschwemmung von einer Plattekultur von Staphylococcus albus versetzt; die Kultur war 24 Stunden alt und dicht bewachsen. Sie wurde mit ca. 10 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung vorsichtig abgeschwemmt. Diese homogene Aufschwemmung wurde in zwei gleichen Portionen in 2 Zentrifugengläser verteilt und dann im Verlauf einer Stunde im Wasserbad bei 58 Grad abgetötet. Darauf zentrifugierte ich beide Röhrchen $^1/_2$ Stunde, und der annähernd gleiche Bodensatz wurde im gleichen Röhrchen mit dem aufgegossenen aktiven bzw.

inaktiven Serum verrieben und nun bei 37 Grad im Brutschrank 4 Stunden lang digeriert. Darauf wurde wieder $^1/_2$ Stunde zentrifugiert. In beiden Röhrchen ließ sich ein annähernd gleicher Bodensatz feststellen.

Alle Kulturen zur Sterilitätskontrolle blieben steril.

Intravenöser Versuch:

Meerschweinchen 220 g. Nach Injektion von 2,5 ccm aktiven „Albus-Serums" trat forciertes Atmen ein, das annähernd 3 Minuten anhielt und dann langsam zur Norm zurückkehrte. Das Tier blieb am Leben.

Meerschweinchen 210 g. Nach Injektion von 2,5 ccm inaktiven „Albus-Serum" war die Atmung während der Injektion etwas beschleunigt, kurz darauf setzte aber wieder regelmäßige flache Atmung ein.

Lokaler Versuch:

Meerschweinchen 250 g. In die 24 Stunden vorher enthaarte Brust- bzw. Bauchhaut wurden injiziert:

1. 0,1 ccm aktives „Albus-Serum";
2. 0,1 ccm inaktives „Albus-Serum";
3. 0,1 ccm Aufschwemmung von Staphylococcus albus abgetötet;
4. 0,1 ccm Aufschwemmung von Staphylococcus albus nicht abgetötet.

Makroskopischer Befund:

Nach $^1{}_2$ Stunde und nach 2 Stunden war Rötung oder Schwellung an den Injektionsstellen nicht feststellbar.

Nach 24 Stunden (kurz vor der Tötung) war bei $_1$ und $_2$ geringe noch gerade tastbare Infiltration nachzuweisen. Bei $_3$ und $_4$ ließ sich deutlichere Infiltration von Linsen- bzw. Erbsengröße feststellen; wiederum fehlte aber eine wesentliche Rötung oder Schwellung in der Umgebung.

Histologischer Befund:

VI.$_1$). Auf der Muskulatur findet sich ein Infiltratstreifen, der in der Mitte des Präparates, also an der Impfstelle am breitesten ist. Die Infiltrate bestehen in der Hauptsache aus polymorphkernigen Leukocyten (Oxydase-Reaktion positiv). Sie verlieren sich in den seitlichen Partien des Präparates und auch etwas in das subepidermale Bindegewebe hinein. Ödem, ödematöse Verquellung des Bindegewebes sowie Nekrosen sind nicht feststellbar. Die größeren Gefäße sind meist weit und enthalten Blut.

VI.$_2$). Im wesentlichen ist hier der gleiche Befund wie bei $_1$ zu erheben, nur erscheinen die Infiltrate etwas dichtzelliger; auch sieht man kleinere Hämorrhagien.

VI.$_3$). In der Mitte des Präparates liegt ein kleiner Infiltratsaum auf der Muskulatur. Er besteht in der Hauptsache aus Leukocyten

und wenigen Lymphocyten. Was seine Größe angeht, so ist er kaum halb so groß wie die Herde bei 1 und 2.

VI.4). Es findet sich ein breiter und stark zellhaltiger Infiltratsaum mit Abzeßbildung an der Impfstelle. Die Infiltrate strahlen ziemlich stark in die Umgebung aus. Ödematöse Lockerung des Gewebes und kleinere Hämorrhagien sind stellenweise erkennbar. Im ganzen liegt das Bild einer mäßig starken, stellenweise eitrigen Entzündung vor.

Resultate zu Versuchsreihe VI.

Auch bei Kontakt mit abgetötetem Mikroorganismen tritt im aktiven Serum eine Blutgiftung ein, die zu Erscheinungen führt, die man dem akuten rudimentären Schock in diesem Versuch zurechnen kann. Das gleichartig vorbehandelte inaktive Serum bleibt bei intravenöser Injektion wirkungslos.

Die lokalen Injektionen führen ebenfalls zu Entzündungserscheinungen, die aber hinter denen der vorhergehenden Versuche bezüglich der Stärke etwas zurücksteht. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Entzündungserscheinungen von aktivem oder inaktivem Serum ist nicht zu erkennen.

In Kontrollversuchen sieht man, daß die abgetöteten Kulturen von Staphylococcus albus in Aufschwemmung mit physiologischer Kochsalzlösung nur ganz gering entzündungserregend wirken, während die nicht abgetöteten Kokken für das Meerschweinchen virulent sind und zu einer mäßig starken eitrigen Entzündung bei kutaner Injektion geführt haben.

In der Folge lag mir daran, stärkere Ausfälle bei dem intravenösen Versuch zu erzielen, d h. akuten letalen Schock; weiterhin wollte ich nochmals prüfen, ob ein Unterschied besteht in der Wirkung der Seren nach Vorbehandlung mit unbelebten und belebten Kontaktsubstanzen bei Verwendung des gleichen Mischserums. Als belebte Substanz wählte ich nunmehr eine Mischung von Stäbchen und Kokken (Bakterium pyoceaneum und Staphylococcus aureus). Außerdem verlängerte ich die Digerierungsdauer auf 12 Stunden. Eine noch längere Zeit schien mir nicht ratsam, da eine Auslaugung der Mikroorganismen, wie sie Dold (7) festgestellt hat, den Ausfall der lokalen Versuche beeinflussen könnte. Als unbelebte Kontaktsubstanz verwendete ich die für den Versuch II hergestellte Inulinsuspension, um mit diesem Material auch einen Kontrollversuch zum Versuch II zu erhalten. Weiterhin wollte ich das Verhalten des Zentrifugates weiter verfolgen. Da sich bei „Agarserum" nur im aktiven Serum ein Bodensatz gebildet hatte, konnte ich bei weiteren Versuchsreihen auch das Zentrifugat des inaktiven Serums zum Vergleich heranziehen. Natürlich kam wegen der kleinen Menge des Zentrifugates nur ein Experiment im lokalen Versuch in Frage.

Um eine gewisse Sicherheit zu erlangen, daß die von mir durch verschiedene Vorbehandlung des aktiven Serums erhaltene Blut-

giftung tatsächlich den Serotoxinen der Autoren entsprach, mußte ich noch andere Kriterien der Serotoxine heranziehen, und es erschien mir der Komplementschwund der Serotoxine ein weiteres Charakteristikum. Ich prüfte daher die in den folgenden Versuchen mit Kontaktsubstanzen behandelten Seren auch auf ihre komplettierende Fähigkeit im spezifischen Hämolyseversuch.

Versuchsreihe VII.

Mit 10 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung wurde eine dicht bewachsene Plattenkultur, die reichliche Kulturen von Bakterium pyoceaneum und Staphylococcus aureus enthielt, abgeschwemmt; diese Suspension wurde in 2 gleichen Hälften auf 2 sterile Zentrifugengläser verteilt und zentrifugiert, bis sich ein Bodensatz gebildet hatte, der 1 bis $1^1/_2$ Normalösen Bakterienkultur entsprach. Nach Abgießen der überstehenden noch ziemlich getrübten Flüssigkeit wurde im gleichen Glas der Bodensatz mit je 4,5 ccm aktivem und inaktivem Mischserum sorgfältig verrieben und darauf 12 Stunden bei 37 Grad digeriert. Nach weiterem halbstündigem Zentrifugieren waren die beiden Seren praktisch klar, der Bodensatz in beiden Röhrchen annähernd gleich stark.

Intravenöser Versuch:

Meerschweinchen 210 g. Nach Injektion von 4 ccm aktiven „Mikrobenserums" stellt sich stark forcierte krampfartige Atmung ein; das Tier zittert stark, der Zustand hält gut 3 Minuten an und darauf erfolgt langsame Erholung.

Meerschweinchen 200 g. Nach Injektion von 4 ccm inaktiven „Mikrobenserums" war schnellere Atemtätigkeit zu beobachten; manchmal ging der Atem stoßartig, aber nie deutlich krampfartig. Nach etwa 3 Minuten ging die Atemtätigkeit in gleichmäßige ruhige flache Atmung über.

Lokaler Versuch:

In die ca. 24 Stunden vorher enthaarte Haut eines mittelgroßen Meerschweinchens wurde injiziert:

1. 0,1 ccm „Mikrobenserum" aktiv;
2. 0,1 ccm „Mikrobenserum" inaktiv;
3. 0,1 ccm „Mikrobenserum" aktiv Zentrifugat;
4. 0,1 ccm „Mikrobenserum" inaktiv Zentrifugat;
5. 0,1 ccm Mikroben abgetötet;
6. 0,1 ccm Mischserum unbehandelt.

Makroskopischer Befund:

Nach einer halben und nach 2 Stunden war keine Reaktion an den Impfstellen zu erkennen.

Nach 24 Stunden (kurz vor der Tötung): an allen Injektionsstellen finden sich etwa linsengroße Verhärtungen ohne Rötung oder

ödematöse Schwellung der Umgebung. Bei 3 und 4 waren die Infiltrationen etwas deutlicher zu tasten.

Histologischer Befund:

VII.1). Es findet sich ein nur schmaler, aber ziemlich ausgedehnter Streifen von Leukocyten im subkutanen Gewebe auf der Muskelfascie. Die Infiltrate strahlen nur gering in die darunterliegenden Muskelinterstitien ein. Ödematöse Lockerung sowie ödematöse Verquellung und Nekrosen sind nicht erkennbar.

VII.2). Der Infiltratsaum ist etwas breiter, aber nicht so ausgedehnt, im übrigen ist der gleiche Befund wie bei 1 zu erheben.

VII.3). Hier sieht man an der Impfstelle einen ziemlich umschriebenen Abzeß ohne größere Infiltrationen der Umgebung ab, im Gegensatz zur anderen Seite, wo man einen ziemlich breiten bandförmigen Infiltratstreifen erkennt. Eine stärkere ödematöse Lockerung sowie ödematöse Verquellung der Bindegewebsfasern findet sich nicht.

VII.4). Eine einheitliche Abszeßbildung ist nicht zu erkennen; doch sieht man an der Impfstelle mehrere kleine Einschmelzherde. Im ganzen sind die Infiltrate etwas breiter und ausgedehnter, aber weniger dicht liegend. Im übrigen ist der gleiche Befund zu erheben wie bei 3.

VII.5). Es findet sich eine sehr starke, teils abszedierende, teils mehr phlegmonös das Bindegewebe und die obersten Muskelschichten durchsetzende Entzündung. Ödematöse Lockerung und Durchtränkung des Gewebes, sowie Hämorrhagien sind vorwiegend in den Randpartien der Präparate erkennbar.

VII.6). Der Muskulatur liegt ein nur schmaler Infiltratsaum auf, der in der Hauptsache aus Leukocyten besteht. Keine ödematöse Lockerung keine Nekrosen erkennbar.

(Kontrollversuch zur Prüfung des Komplementgehalts, hinter Versuch VIII beschrieben. Resultate hinter Versuchsreihe IX.)

Versuchsreihe VIII.

Die Vorbehandlung des Serums geschah zu gleicher Zeit und in der gleichen Anordnung wie bei Versuch VII; es wurde auch das gleiche Mischserum benutzt. Statt der Mikroorganismen wurde Inulin als Kontaktsubstanz angewandt, und zwar je 4,5 ccm aktiven bzw. inaktiven Mischserums wurden mit je 1 ccm der für Versuch II hergestellten Inulinsuspension versetzt.

Intravenöser Versuch:

Meerschweinchen 220 g. Nach Injektion von 4 ccm aktiven „Inulinserums" setzte sofort starkes krampfartiges Atmen ein, das sich nach ca. 2 Minuten bis zu deutlichem Flankenziehen verstärkte; es erfolgte eine nur ganz allmählich einsetzende Erholung. Nach

2 Stunden zeigte das Tier noch gesträubtes Fell und manchmal geringes Zittern. Kein Tod.

Meerschweinchen 230 g. Während der Injektion von 4 ccm inaktiven „Inulinserums" war etwas schnellere Atmung erkennbar, die etwa eine halbe Minute nach der Injektion in gleichmäßige Atmung überging.

Lokaler Versuch:

In die ca. 24 Stunden vorher depilierte Haut eines mittelgroßen Meerschweinchens wurde injiziert:

1. 0,1 ccm „Inulinserum" aktiv;
2. 0,1 ccm „Inulinserum" inaktiv;
3. 0,1 ccm „Inulinserum" aktiv Zentrifugat;
4. 0,1 ccm „Inulinserum" inaktiv Zentrifugat;
5. 0,1 ccm Mischserum aktiv unbehandelt.

Makroskopischer Befund:

Nach einer halben und nach 2 Stunden war keine Rötung oder Schwellung an den Injektionsstellen zu erkennen.

Nach 24 Stunden (kurz vor der Tötung) konnte man bei 1 und 2 etwa linsengroße Verhärtungen an der Impfstelle tasten. Bei 3 und 4 waren diese Infiltrationen etwas größer. Aber auch hier zeigte sich keine wesentliche Rötung. Bei 5 war eine nur eben noch tastbare Verhärtung festzustellen. Nirgends fand sich eine teigige Schwellung oder gar Nekrose.

Histologischer Befund:

VIII.$_1$). Es findet sich ein mäßig breiter Infiltrationsherd an der Impfstelle, der sich nach den seitlichen Partien zu verjüngt. An der breitesten Stelle dringen die Infiltrate auch in die Muskelinterstitien ein. Im Vergleich zu dem Versuch VII$_1$ sind hier die Infiltrate stärker entwickelt; es ist aber auch hier keine ödematöse Verquellung der Bindegewebsfasern oder Nekrose erkennbar.

VIII.$_2$). Die Infiltrate sind ebenso breit entwickelt wie bei VIII$_1$; sie stehen aber nicht ganz so dicht, doch strahlen sie etwas stärker als bei 1 in kleineren Zügen in die Umgebung aus.

VIII.$_3$). Hier liegen die Infiltrate mehr gehäuft, stellenweise, besonders an der Impfstelle, bis zur Bildung kleiner Abszesse vermehrt; aber auch in der Umgebung der Impfstelle sind ziemlich reichliche Infiltrate im Bindegewebe vorhanden. Auch die Muskulatur ist befallen; zwischen den Muskelschichten sieht man Ansammlungen von Kleinzellen, vorwiegend polymorphkernige Leukocyten. (Wahrscheinlich wurde nicht nur subkutan, sondern auch intramuskulär injiziert.) Weiterhin finden sich kleinere Hämorrhagien und etwas Ödem, vorwiegend in den Randpartien. Ödematöse Verquellung der Bindegewebsfasern ist aber nicht festzustellen.

VIII.$_4$). Im wesentlichen ist hier der gleiche Befund wie bei VIII$_3$ zu erheben. Auch hier findet man Abszedierung in der Subkutis mit Ausläufern von Infiltraten in das Bindegewebe und die Muskulatur der Umgebung. Keine Verquellung der Bindegewebsfasern.

VIII.$_5$). Im Vergleich zu den vorhergehenden Präparaten des Versuchs VIII findet sich hier die schwächste Infiltration in Form eines nur schmalen Saumes von Infiltraten auf der obersten Muskelfascie und in den obersten Muskelinterstitien, noch am dichtesten in der Mitte des Präparates, also an der Impfstelle. Auch hier ist nichts von Ödembildung und ödematöser Verquellung der Bindegewebsfasern zu sehen.

Kontrollversuch zur Prüfung des Komplementgehalts:

Es wurde das „Mikrobenserum" des Versuchs VII und das „Inulinserum" des Versuchs VIII auf ihre komplettierenden Fähigkeiten im spezifischen Hämolyseversuch geprüft. Bei Ausführung der Versuche waren beide Seren insgesamt 24 Stunden digeriert und zwar 12 Stunden bei 37 Grad im Brutschrank, wie sie zum intravenösen bzw. lokalen Versuch VII und VIII benutzt waren. Aus äußeren Gründen konnte ich die Hämolyseversuche erst nach weiteren 12 Stunden ausführen. Während dieser Zeit blieben die Seren mit den Kontaktsubstanzen im Eisschrank. Den Bodensatz hatte ich wieder ausgeschüttelt so daß man also während dieser Zeit auch von einer Digerierung sprechen kann. Zentrifugiert wurde 20 Minuten lang. Geprüft wurde das aktive und inaktive „Mikrobenserum" und „Inulinserum", weiterhin das aktive und inaktive unbehandelte Mischserum und zur Kontrolle wurde ein Hämolyseversuch auch mit zur Wassermann'schen Reaktion verwandten Serum angesetzt. Bei allen Versuchen wurde mit einer Verdünnung der verschiedenen Seren von 1:10 gearbeitet.

Vorversuch:

Hammelblutamboceptor Titer 1:6000	1:100	0,5 ccm	}	Kompl. Haemolyse
Wassermannkomplement	1:10	0,5 ccm		
Hammelblutkörperchenaufschwemmung	1:10	0,5 ccm		
Amboceptor 1	1:100	0,5 ccm	}	Keine Haemolyse
Hammelblutkörperchenaufschwemmung	1:10	0,5 ccm		
Wassermannkomplement	1:10	0,5 ccm	}	Keine Haemolyse
Hammelblutkörperhen	1:10	0,5 ccm		
Amboceptor	1:100	0,5 ccm	}	Kompl. Haemolyse
Mischserum (unbehandelt)	1:10	0,5 ccm		
Hammelblutkörperhen	1:10	0,5 ccm		

Amboceptor	1:100	0,5 ccm	Keine Haemolyse
Mischserum inaktiv	1:10	0,5 ccm	
Hammelblutkörperhen	1:10	0,5 ccm	
Amboceptor	1:100	0,5 ccm	Keine Haemolyse
„Mikrobenserum" aktiv	1:10	0,5 ccm	
Hammelblutkörperhen	1:10	0.5 ccm	
Amboceptor	1:100	0,5 ccm	Keine Haemolyse
„Mikrobenserum" inaktiv	1:10	0,5 ccm	
Hammelblutkörperhen	1:10	0,5 ccm	
Amboceptor	1:100	0,5 ccm	Keine Haemolyse
„Inulinserum" aktiv	1:10	0,5 ccm	
Hammelblutkörperhen	1:10	0,5 ccm	
Amboceptor	1:100	0,5 ccm	Keine Haemolyse
„Inulinserum" inaktiv	1:10	0,5 ccm	
Hammelblutkörperhen	1:10	0,5 ccm	

Versuchsreihe IX.

Noch einen weiteren Versuch möchte ich anführen, der mir der Mitteilung wert erscheint. Von dem Serum der Tiere des lokalen Versuches VII und VIII konnte ich bei Digerieren mit Staphylococcus aureus ein Serotoxin gewinnen, das im intravenösen Versuch den stärksten Ausfall aller vorhergehenden Versuche zeigte. In diesem Fall ging ich in der Weise vor, daß ich in das sterile aktive bzw. inaktive Serum 3 Normalösen einer 24stündigen Schrägagarkultur verrieb, die vorher im Dampftopf abgetötet war. Es wurde dann 2 Stunden im Brutschrank digeriert und weitere 20 Stunden im Eisschrank belassen.

Alle Sterilitätskontrollen ergaben kein Wachstum von Mikroorganismen.

Intravenöser Versuch:

Meerschweinchen 300 g. Die Injektion von 3,5 ccm ergab ein hochgradig krampfartiges Atmen, das fast $^3/_4$ Stunde lang anhält und von häufigem Zittern unterbrochen wird. Die Haare des Tieres waren gesträubt. Es erfolgte auch Abgang von Kot und Urin. Das Tier machte einen deutlich kranken Eindruck. Es erholt sich nur langsam. Der Tod trat nachträglich nicht ein.

Meerschweinchen 280 g. Nach Injektion von 3,5 ccm inaktiven Aureusserum zeigt sich für etwa $^1/_2$ Minute etwas forciertes Atmen, dann schnelle Erholung.

Lokaler Versuch:

In die 24 Stunden vorher depilierte Brust- bzw. Bauchhaut wurde kutan injiziert:

1. 0,1 ccm „Aureusserum" aktiv;
2. 0,1 ccm „Aureusserum" inaktiv;

(Mit aktivem und inaktivem unbehandeltem Mischserum wurden zwar gleichzeitige Kontrollinjektionen am gleichen Tier vorgenommen, die aber nicht verwertbar sind, weil sich das unbehandelte Mischserum als unsteril erwies. Das vorbehandelte Serum war durchaus steril.)

Makroskopischer Befund:

Nach einer halben und 2 Stunden war keine wesentliche Rötung und Schwellung zu erkennen; nach 24 Stunden fühlte man eine linsengroße Infiltration an beiden Impfstellen, wiederum ohne wesentliche Schwellung und Rötung.

Histologischer Befund:

IX.$_1$). Auf der Muskelfascie im kutanen Gewebe liegt eine wechselnd breite Schicht von Infiltraten, die in der Mitte am breitesten ist. Hier liegen wiederum die Infiltrate mehr diffus, im Gegensatz zu den Randpartien, wo die Kleinzellen reihenförmig angeordnet sind. Die Zellen bestehen in der Hauptsache aus Leukocyten (Oxydase-Reaktion positiv). Eine deutliche ödematöse Durchtränkung des Gewebes sowie eine Verquellung der Bindegewebsfasern und Nekrosen sind nicht feststellbar. Die Reaktion auf die Injektion ist nicht stärker als in den vorhergehenden Versuchen.

IX.$_2$). Es ist im wesentlichen der gleiche Befund wie bei IX$_1$ zu erheben.

Resultate der Reihen VII, VIII und IX.

Der Tod des Versuchstieres im akuten Schock wurde in keinem Fall erreicht. Allerdings hatte man den Eindruck, daß bei Verschieben der quantitativen Verhältnisse des intravenösen Versuchs bei Experiment IX der Tod zu erreichen gewesen wäre, wenn ein weniger starkes Meerschweinchen zur Verfügung gestanden hätte, oder eine größere Dosis von Serotoxin injiziert worden wäre. Unterschiede im Ausfall der intravenösen Injektion nach Verwendung belebter oder unbelebter Kontaktsubstanz waren nicht festzustellen. Dagegen zeigte der lokale Versuch einen verschiedenen Ausfall bezüglich der Stärke der Infiltrate. Mit dem „Inulinserum" des Versuchs VIII waren stärkere Entzündungserscheinungen auszulösen als nach Injektion der übrigen Serotoxine. Die Zentrifugate der Serotoxine, d. h. also die ausgeschleuderte Kontaktsubstanz ergibt stärkere Entzündungserscheinungen beim lokalen Versuch als die Kontaktseren selbst. Ein Unterschied zwischen aktivem und inKaktivem Zentrifugat besteht aber nicht. Der spezifische Hämolyseversuch zeigt, daß aktives mit Kontaktsubstanz vorbehandeltes Serum seine komplettierende Fähigkeit verliert.

Versuch A.

Zu diesem Versuch benutzte ich Meerschweinchenmischserum, das zur Wassermannschen Reaktion im Verhältnis 1:10 verdünnt war. Die eine Hälfte wurde wieder inaktiviert und dann je 8,5 ccm mit einer abgetöteten Staphylococcus-aureus-Kultur verrieben. Es wurde dann 3 Stunden im Brutschrank bei 37 Grad digeriert, darauf die Portionen noch 23 Stunden im Eisschrank gehalten und dann eine halbe Stunde zentrifugiert. Das überstehende Serum war durchaus klar.

Intravenöser Versuch:

2 Meerschweinchen von ca. je 220 g erhielten 5 ccm unbehandelten verdünnten Serums intravenös. Die Injektion wird ohne Besonderheiten vertragen.

Meerschweinchen 250 g. Nach Injektion von 4,5 ccm verdünnten Aureusserums zeigt sich deutliche krampfartige Atmung, die etwa 5 Minuten anhält, darauf erfolgt langsame Erholung.

Meerschweinchen 200 g. Nach Injektion von 4,5 ccm inaktiven verdünnten Aureusserum zeigt sich lediglich geringe beschleunigte Atmung für kurze Zeit.

Leider ergaben die Sterilitätskontrollen ein Wachstum von Mikroben, so daß ein lokaler Versuch, der zwar angestellt wurde, nicht verwertet werden konnte.

Versuch XI.

3 Meerschweinchen wurde durch Punktion der Vena jugularis $1^1/_2$—2 ccm Blut entnommen. Bevor noch eine Gerinnung eintrat, konnte das Blut aus der Rekordspritze in ein Zentrifugenglas entleert werden. Nach 16 Stunden wurde das überstehende Serum nach vorher erfolgtem Zentrifugieren abgegossen, in 2 Portionen geteilt und 1 Stunde inaktiviert.

Lokaler Versuch:

2 Meerschweinchen erhielten je eine Injektion von 0,1 ccm aktiven und inaktiven Serums der 3 Spendertiere.

Makroskopischer Befund:

Nach einer halben und nach 2 Stunden war keine Rötung oder Schwellung der Injektionsstellen zu erkennen.

Nach 24 Stunden (kurz vor der Tötung): Kaum tastbare Verhärtungen sind an den Impfstellen feststellbar. Ohne Rötung.

Histologischer Befund.

Da sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten ergaben, kann man den Befund gemeinsam zusammenstellen. Es fand sich nämlich lediglich eine geringe Zellinfiltration

vorwiegend aus polymorphkernigen Leukocyten an der Impfstelle. Stellenweise zeigte sich geringe Lockerung des Gewebes durch Ödem. Die Veränderungen sind ganz auf die Injektionsstelle beschränkt.

Resultat von Versuch XI.

Nach Injektion von aktivem und inaktivem Einzelserum von verschiedenen Tieren ist ein verwertbarer Unterschied zwischen der Reaktion des aktiven und inaktiven Serums nicht zu erkennen. Die Stärke der Infiltrate sind in dem vorliegenden Versuch bedeutend geringer als in den Präparaten $_3$ und $_4$ der Versuchsreihen I, II und III, wo ja ebenfalls unbehandeltes aktives und inaktives Serum injiziert worden war.

Versuch XII.

5 ccm Serum, durch Entbluten aus Normaltier entnommen, wurde in eine sterile Petrischale, die mit Plastilin verschlossen war, 4 Tage im Brutschrank bei 37 Grad gehalten. Es zeigte sich eine leichte Trübung und Ausflockung des Serums. Die gröberen Ausflockungen wurden durch halbstündiges Zentrifugieren sedimentiert, das Serum blieb aber unklar.

4 ccm dieses Serums wurden intravenös injiziert. Das Tier zeigte stärkste ruckartige Flankenatmung. Der ganze Körper beteiligte sich mit an der Respiration. Der Zustand dauerte $2^1/_2$ Minuten, ging in zunächst beschleunigte Atmung und dann in ruhige, gleichmäßige Respiration über.

Ein lokaler Versuch wurde zwar angesetzt, kann aber keine Verwertung finden, weil die Sterilitätskontrollen nicht steril blieben. Die Aussaat von Bouillonkultur auf der Agarplatte ergab Bakterienwachstum. Die Bouillonkultur selbst war aber nicht wesentlich getrübt, so daß man annehmen darf, daß eine grobe Verunreinigung des Serums nicht vorgelegen hat. Jedenfalls ist es wohl erlaubt, die serotoxischen Eigenschaften, die das Serum im intravenösen Versuch zeigte, auf die Flockung zu beziehen und nicht auf das spärliche Wachstum von Mikroorganismen.

Ergebnisse der Vorversuche.

Wie aus den Versuchsprotokollen hervorgeht, kann man unter den Vorversuchen zwei prinzipiell verschiedene Hauptgruppen unterscheiden, und zwar:

a) Vorversuche, die durch intravenöse Injektion den Nachweis der Blutgiftung nach Vorbehandlung der Seren mit Kontaktsubstanzen durch intravenöse Injektion bringen sollten, und

b) Kontrollversuche, die notwendig waren, um beim Hauptversuch, also bei der lokalen kutanen Injektion der Serotoxine, andersartige Einwirkungen auszuschließen.

Ad a) Zur Prüfung der Blutgiftung, also zum Nachweis der Serotoxine, wurde der intravenöse Versuch in der angegebenen Anordnung durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, daß nach Injektion von aktivem, mit Kontaktsubstanz digiriertem Serum durchweg Krämpfe auszulösen waren. Meist wurde das Tier schon während der Injektion unruhig. Die Atmung wurde unregelmäßig, auch der Herzschlag zeigte gelegentlich Arrhythmen. Sobald das Tier aus der Fesselung befreit war, zeigte es deutliche Krampferscheinungen. Es atmete unter äußerster Anstrengung mit starkem Flankenziehen; es zitterte in unregelmäßigen Schüben am ganzen Körper, wie von Fieberschauern geschüttelt. Das Fell war gesträubt. Abwehrbewegungen wurden meist nicht ausgeführt. Mitunter ging Kot und Urin ab. Die Erholung setzte nur langsam nach Minuten ein, manchmal sogar nach Stunden. Den Tod des Tieres erlebte ich nur einmal bei meinen Versuchen, und auch in diesem Fall nicht im Krampfanfall selbst, sondern erst nach 12 Stunden (Versuch Nr. IV).

Das inaktivierte gleichartig mit Kontaktsubstanz vorbehandelte Serum löst nach intravenöser Injektion niemals derartige Krämpfe aus. Gelegentlich setzte während der Injektion etwas schnellere Atmung ein, die aber durchaus flach blieb, nie von Flankenziehen begleitet war, und meist nach der Injektion in regelmäßige Atemtätigkeit überging.

Die Angaben der Autoren über die Wirkung der Serotoxine ließen sich durch meine Versuche als insofern bestätigen, als Krampferscheinungen nach Injektion von aktivem, mit Kontaktsubstanzen vorbehandeltem Serum eintraten und inaktives, gleichartig digeriertes Serum ziemlich reaktionslos vertragen wurde. Den akuten

Schocktod vermochte ich allerdings nicht zu erzielen. Es erscheint mir aber unberechtigt, daraus zu folgern, daß durch die Digerierung mit den verschiedenen Kontaktsubstanzen keine echten Serotoxine gebildet worden seien. Jedenfalls ist die Forderung Dolds (7) wohl allzu weitgehend, wenn er hervorhebt, daß nur derartige Seren seroserotoxisch sein sollen, die auch den Tod des Kontrolltieres unter Krämpfen unmittelbar im Anschluß an die Injektion herbeiführen. Er macht nämlich selbst schon auf quantitative Bedingungen als ausschlaggebenden Faktor aufmerksam: stärkere Tiere (über 250 g) benötigen größere Serummengen zur Herbeiführung des Todes. Es erscheint mir dem Wesen der Reaktion näherliegend, weniger diese quantitativen Verhältnisse zu berücksichtigen. Ich möchte größeren Wert auf die qualitative Erwägung legen, daß krampfartige Erscheinungen mit Sicherheit beim aktiven Serum auszulösen waren, während das inaktive Serum keinen Ausschlag gab. Der jeweilige Unterschied zwischen den Wirkungen des aktiven und inaktiven Serums scheint mir jedenfalls ein größerer Beweis für das Vorhandensein von Serotoxinen zu sein, als der von quantitativen Bedingungen abhängige Schocktod. Ich bin davon überzeugt, daß ich durch entsprechende Steigerung der injizierten Serummenge immer den von Dold (7) geforderten Schocktod hätte erzielen können; aus Ersparnisgründen habe ich aber von derartigen Versuchen Abstand nehmen müssen, zumal Dold (6) auch in seinen letzten Veröffentlichungen selbst krampfartige Erscheinungen als Kriterien der Blutgiftung gelten läßt. Wenn ich also die Auslösung von Krämpfen schon als Beweise für die Bildung von Serotoxinen ansehe, so mache ich damit praktischen Gebrauch von der Doerr'schen Einteilung der Schockwirkungen, der auch beim akuten Allgemeinschock den eingangs beschriebenen rudimentären Schock abgrenzt. Ich setze also meine Versuchsergebnisse bezüglich des Allgemeinschocks diesem rudimentären Schock im Rahmen der Serotoxine unter den entsprechenden Einschränkungen gleich.

Um aber einen weiteren Beweis zu erhalten, daß sich wirklich die Sera nach Vorbehandlung mit Kontaktsubstanzen umgewandelt haben, untersuchte ich nach dem Vorgang von Nathan (25), ob ein Komplementschwund nach der Vorbehandlung eingetreten war. Ich benutzte dazu das Beispiel der spezifischen Hämolyse mit hämolysierendem Kaninchenserum als Ambozeptor mit Hammelblutkörperchen und mit behandeltem und unbehandeltem Meerschweinchenserum (siehe Versuchsprotokoll Nr. VII und VIII). Es ergab sich hier eine ganz deutliche Hemmung der Hämolyse beim behandelten aktivem Serum im Gegensatz zur kompletten Hämolyse beim unbehandeltem Serum. Bemerkenswert erscheint mir auch außerdem die Feststellung, daß bei den aktiven vorbehandelten Seren, bei denen also die Hämolyse ausblieb, die Abscheidung eines Bodensatzes im Reagenglas schon nach 10 Minuten zu beobachten war, während bei den inaktiven Seren die Blutkörperchen viel langsamer sedimentie-

ten. Die inaktiven Seren sind also offenbar in der Lage, korpuskuläre Elemente länger in Suspension zu halten. Dieser Unterschied weist doch wohl auch auf differente physikalische Zustände hin.

An dieser Stelle möchte ich auch auf einen Versuch hinweisen (Nr. XII), der ebenfalls auf die physikalischen Veränderungen hindeutet und der eine gewisse Bestätigung der Versuche Dold's (5) darstellt. Ich konnte nämlich mit aktivem Serum allein ohne weitere Vorbehandlung Krämpfe durch intravenöse Injektion äuslösen, wenn das Serum lediglich durch längeres Verweilen im Brutschrank zur Flockung gebracht worden war. Eine Auswertung der Resultate des lokalen Versuchs mußte aber unterbleiben, da die Sterilitätskontrollen keine einwandfreien Resultate ergeben hatten. So stark war aber keinesfalls die Verunreinigung, daß man schon die Veränderungen des Serums auf Wirkung der Mikroorganismen zurückführen müßte. Die von dem Serum angelegte Bouillonkultur ergab kein stärkeres Bakterienwachstum, lediglich auf der davon ausgestrichenen Platte sah man einige Kolonien. Immerhin mußte dieser geringe Befund einer möglichen Verunreinigung, wenn man wirklich kritisch sein wollte, bereits genügen, um die Nicht-Verwendbarkeit der Resultate für den Hauptversuch darzutun.

Es war aber mein Bestreben, auch möglichst hoch wirksame Seren, d. h. solche, die schwerste anaphylaxieartige Erscheinungen beim intravenösen Versuch auslösen, mit weniger stark wirksamen im lokalen Versuch auf ihre entzündungserregende Wirkung in Vergleich zu stellen. Ich variierte daher sowohl die Kontaktsubstanz, als auch die Digerierungsdauer. Es wurden Sera zwischen 2 unter 21 Stunden der Digerierung im Brutschrank ausgesetzt, zum Teil wurde auch mehrere Stunden im Brutschrank digeriert und darauf das Serum ohne vorheriges Zentrifugieren bis zu 20 Stunden im Eisschrank gelassen. Ebenso wie bei den übrigen Autoren, die sich mit der Herstellung von Serotoxinen befaßten, spielte auch in meinen Versuchen die Digerierungsdauer und -art keine ausschlaggebende Rolle für die Stärke des Schockausfalls. Weiterhin zeigt auch die Menge der zugeführten Kontaktsubstanz innerhalb der den Literaturangaben entsprechenden Grenzen keine einschneidende Bedeutung. Agar und Inulinsuspension mischte ich im Verhältnis von 1:4, in der Versuchsreihe IV auch 0,25:5. Bei Verwendung von Mikroorganismen verwandte ich 1—2 Normalösen auf je 4—5 ccm Serum. Den stärksten Ausfall erhielt ich bei Verwendung von Staphylococcus aureus (Versuchsreihe Nr. IX) und einer Digerierungsdauer von 2 Stunden im Brutschrank und 20 Stunden im Eisschrank. Aber auch hier war der Tod des Tieres (300 g schwer) bei Injektion von 4 ccm nicht zu erreichen. Dagegen war das Verhalten des mit inaktivem Serum gespritzten Kontrolltieres, das keinerlei Krampferscheinungen zeigte, gerade in diesem Fall auffällig unterschiedlich.

In diesem Zusammenhang darf auch auf den Versuch Nr. X hingewiesen werden, der mit einem vor der Digerierung mit Kontakt-

substanz auf 1:10 verdünnten Serum angestellt wurde. Das derartig verdünnte Serum wurde 3 Stunden mit einer abgetöteten Kultur von Staphylococcus aureus versetzt und 3 Stunden digeriert. Bei Verwendung von 4.5 ccm aktivem Serum bei einem Meerschweinchen von 250 g zeigten sich heftige Krämpfe, die gut 2 Minuten anhielten, während die gleiche Menge inaktiven gleichartig vorbehandelten Serums wiederum keine Erscheinungen auslöste. Um den Einfluß des unbehandelten verdünnten Serums überhaupt zu studieren, wurden zwei weitere Tiere mit aktivem bzw. inaktivem unbehandelten, verdünnten Serum injiziert, beiden Tieren wurden 5 ccm intravenös rasch zugeführt, ohne daß irgendwelche Erscheinungen auftraten. Also auch in Serumverdünnungen tritt eine Blutgiftung durch entsprechende Vorbehandlung ein, eine Tatsache, die insofern Wert hat, als man die Kosten derartiger Experimente vermindern kann. Einstweilen aber machte ich davon noch keinen Gebrauch, um möglichst unkomplizierte Versuchbedingungen zu erhalten. Insgesamt läßt sich also zu der ersten Reihe der Kontrollversuche feststellen, daß es tatsächlich gelingt, mit Hilfe von entsprechenden Kontaktsubstanzen aktive Meerschweinchenseren so zu verändern, daß sie beim intravenösen Versuch anaphyloxieähnliche Erscheinungen darbieten, m. a. W. sie serotoxisch zu machen. Der Grad der Toxizität erscheint in meinen Versuchen unabhängig von der Kontaktsubstanz selbst, dem Mischungsverhältnis mit dem Serum innerhalb der in der Literatur angegebenen Grenzen, und der Digerierungsdauer bei Anwendung von Brutschrank- oder Eisschranktemperatur. Als positiver Reaktionsausfall sind schon Schockkrämpfe in Analogie zum rudimentären anaphylaktischen Schock Doerr's (3) zu bewerten. Ausschlaggebendes Kriterium für die Serotoxinbildung ist also nicht der Eintritt des Schocktodes, sondern das ausgesprochen differente Verhalten des aktiven vorbehandelten Serums zum inaktivierten. Auch in Serumverdünnungen ist eine Blutgiftung durch entsprechende Vorbehandlung zu erzeugen.

Ad b) In Kontrollversuchen mußten, um Faktoren zu erkennen, die auf die lokale Serotoxinentzündung von Einfluß waren, zwei Fragen berücksichtigt werden.

1. Ist das unbehandelte Meerschweinchenserum schon für Meerschweinchen lokal entzündungserregend? und
2. welchen Entzündungseffekt erzielt man nach der kutanen Injektion der verschiedenen Kontaktsubstanzen allein?

Zur ersten Frage haben in der Literatur Gerlach (14) und Dold und Rados (8) in Form von Vorversuchen Stellung genommen. Gerlach stellte lediglich eine geringe „resorptive Entzündung" mit geringer Exsudation von polymorphkernigen Leukocyten fest.

Dold und Rados beobachteten am Auge bei ihren nur makroskopisch beurteilten Untersuchungen keinerlei Entzündungserscheinungen. Eine ähnliche Fragestellung bei anderen Arbeitshypothesen und bei Verwendung von Vollblut, aber nicht von Serum allein bearbeiteten auch Letterer (21) und Geißendörfer (13). Auch diese Autoren konnten geringe Zellreaktionen bei einmaliger Injektion von artgleichem Vollblut erkennen.

Bei meinen Versuchen, die zunächst im Rahmen der Hauptversuche durchgeführt wurden, konnte ich die weitere Frage aufwerfen, ob das unbehandelte Einzelserum sich anders verhält, als ein Mischserum von mehreren Meerschweinchen; weiterhin, ob aktives und inaktives Serum Unterschiede der Entzündungsstärke und -art aufweisen.

Gemeinsam ist allen einschlägigen histologischen Präparaten die erkennbare, mehr oder weniger deutliche leukocytäre Reaktion. Zur ersten Frage, ob zwischen Einzel- und Mischserum ein Unterschied besteht, zeigt ein Vergleich der entsprechenden Protokollierungen (I_3 und $_4$, II_3 und $_4$, III_3 und $_4$ mit IV_3, VII_6 und VIII_5), daß keine prinzipiellen Unterschiede zu konstatieren sind. Alle neun Schnittserien weisen fast gleiche Reaktionen auf. Für die festzustellenden geringen Variationen der Infiltrationsstärke, die erst nach eingehender Durchmusterung der Serien zu beobachten waren, haben andere Erklärungsmöglichkeiten mehr Wahrscheinlichkeit für sich. So konnte manchmal eine geringe Differenz zwischen der Infiltrationsstärke nach Injektion einerseits von aktivem, andererseits von inaktivem Serum festgestellt werden, die aber nicht gleichsinnig war. Während z. B. in der Versuchsreihe I das inaktive Serum (I_4) eine stärkere Entzündung hervorruft, als das aktive Serum (I_3), ergab sich bei Versuchsreihe II das umgekehrte, und bei Versuchsreihe III war kein Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Serum nach kutaner Injektion zu erkennen. Bei diesen ersten drei Versuchen wurden Einzelsera verwandt, also zu Kontroll- und Hauptversuchen je das Serum eines Tieres benutzt. Es wäre also möglich, daß die einzelnen Tiersera verschieden starke entzündungserregende Wirkung haben können, je nachdem man sie in aktivem oder inaktivem Zustand verwendet. Aus diesem Grunde wurden noch drei weitere Versuche mit Einzelseren angestellt (Versuch Nr. XI). Auch diese Versuchsreihe zeigte Unterschiede, die aber wiederum nicht gleichsinnig waren. Höchstens kann man sagen, daß häufiger bei den durch inaktives Serum hervorgerufenen Erscheinungen der Entzündungsherd selbst etwas lockerer (mehr ödematös) erschien. Bei diesen Versuchen ergab sich aber ein mir wesentlich erscheinender Befund. Es zeigte sich nämlich, daß bei letzteren Versuchen die Entzündungserscheinungen im Ganzen bedeutend geringer erschienen, besonders was die stärkere leukocytäre Reaktion anbetrifft, als bei den übrigen Versuchen, wo ebenfalls lediglich mit sterilem aktivem bzw. inaktivem Serum gearbeitet wurde. Ich möchte diesen Unterschied darauf zu-

rückführen, daß in Versuch XI zwei Tiere verwandt wurden, die lediglich kutane Injektion mit unbehandeltem Serum erhielten, bei denen also keine weiteren Entzündungsherde stärkerer Natur gesetzt wurden. Es erscheint mir daher möglich, daß die lokalen Entzündungserscheinungen beim gleichen Tier davon abhängig sein können, ob an irgendeiner anderen Stelle bereits stärkere Entzündungserscheinungen bestehen oder nicht. Zu dieser Auffassung paßte auch das Verhalten der Infiltration bei den Versuchen VII_6 und VIII_5, wo in beiden Fällen das gleiche aktive unbehandelte Mischserum injiziert worden war. In beiden Fällen wurde ein augenscheinlicher Unterschied der leukocytären Reaktion hervorgerufen. Die Entzündung bei VIII_5 war sicher stärker als bei VII_6. Die Entzündungserscheinungen der Versuchsreihe VIII waren insgesamt stärker als bei Versuchsreihe VII, obwohl auch hier ein starker Entzündungsherd erkennbar war, der aber nur an einer Stelle lokalisiert war. Dafür war aber auch die Reaktion bei VII_6 sicher hochgradiger, als bei den Versuchen der Serie Nr. IX.

Gleichartig verwertbare Resultate waren bei verschiedenen Untersuchungen über den Einfluß physiologischer Kochsalzlösung auf das Gewebe zu gewinnen. Nach 24 Stunden findet man, wie schon Gerlach feststellen konnte (14), und wie besonders die genauen Untersuchungen von Berger und Lang (1) ergaben, eine wässrige Durchtränkung des injizierten Gewebes, sowie eine verhältnismäßig geringe leukocytäre Durchsetzung. Genau so wie bei den Kontrollen mit unbehandeltem Serum konnte ich aber hier feststellen, daß der Ausfall der Reaktion ebenfalls davon abhängig ist, ob man ein Tier lediglich zur Kontrolle der Kochsalzeinwirkung benutzt, oder man den Versuch an einem Tier ansetzt, das auch an anderen Stellen schon starke Entzündungsherde aufweist. Jedenfalls war in Vorversuchen zu anderen Arbeitshypothesen, die nicht mit den hier mitgeteilten Versuchsreihen in direktem Zusammenhang stehen, eine auffällig stark zelluläre Reaktion mit reichlicher leukocytärer Durchsetzung des ödematös durchtränkten Gewebes zu erkennen. An diesen Schnitten von der Haut sah man auch an Stellen, die ziemlich weit entfernt von jeder Lokaleinwirkung waren, das perivaskuläre Gewebe bedeutend zellreicher als bei Kontrolltieren.

Mir erscheint dieser Befund bemerkenswert, denn einmal deckt er die Notwendigkeit auf, derartige Kontrollversuche nur an solchen Tieren vorzunehmen, die keine weiteren Entzündungserscheinungen aufweisen, anderseits auch bei solchen quantitativen Arbeiten durch Sektion jeweils festzustellen, daß keine weiteren Entzündungserscheinungen am Versuchstier eine Verstärkung des Reaktionsausfalls verschuldet haben. Zur Erklärung darf man wohl eine höhere Reaktionsbereitschaft des Bindegewebsgefäßapparates bei schon bestehender oder gleichzeitig einsetzender stärkerer Entzündung heranziehen. Darauf soll in einem anderen Zusammenhang eingegangen werden.

Als zweite Frage war in Kontrollversuchen zu berücksichtigen, welche entzündungserregende Wirkung den Kontaktsubstanzen selbst innewohnt. Serotoxine wurden in meinen Versuchen hergestellt mit Agar, Inulin und abgetöteten Mikroorganismen. Es war also die Frage zu prüfen, welche Entzündungserscheinungen die jeweiligen Kontaktsubstanzen allein schon erzeugen können und welche Unterschiede bestehen. Hierzu gehören die Versuche I_5, II_5, III_5, IV_8 und 4 sowie VII_5.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß der Agar nur geringe Reaktion in der von mir verwandten Herstellung auslöst. Man erkennt hier (I_5) nach 24 Stunden um die Injektionsstelle herum eine mittelstarke Exsudation von polymorphkernigen Leukocyten, die z. T. auch in das Agardepot eingedrungen sind. In den entfernteren Partien der Subcutis findet sich ein schmaler Streifen von Infiltraten, die wiederum in der Hauptsache aus polymorphkernigen Leukocyten bestehen. Der Agar, der nach Vorschrift von Bordet bzw. Nathan (23) hergestellt wurde, zeigte eine schwachsaure Reaktion. Jedenfalls ist die Reaktion des Agars von ausschlaggebender Bedeutung, worauf schon die Untersuchungen Gräffs (17) und Schmidtmanns (35) hinweisen.

Weit stärkere Entzündungserscheinungen zeigt das Inulin, insbesondere die Inulinsuspension (II_5). Hier sieht man an der Stelle der Injektion und ziemlich weit darüber hinaus eine deutliche ödematöse Durchtränkung des Gewebes und starke leukocytäre Emigration; besonders reichlich finden sich Leukocyten an der Impfstelle selbst; hier kann man schon von einem Abszeß sprechen. Ausgedehnte Nekrosen finden sich hier nicht. Benutzt man Inulinlösung, so sind die Entzündungserscheinungen viel weniger auffällig (III_5). Man sieht hier keine stärkere Anhäufung von Leukocyten und auch keine wesentliche ödematöse Durchsetzung des Gewebes. Offenbar wird die Lösung unter weniger starker Reaktion vom Körper resorbiert, also die Suspension, die noch korpuskuläre Inulinteilchen enthält, die lokal stärker reizen und erst durch Ödem verflüssigt werden müssen, ehe ein Abtransport bzw. ein Abbau erfolgt.

Auch bei der Prüfung der Mikroorganismen, die als Kontaktsubstanz Verwendung fanden, ergaben sich Unterschiede der entzündungsauslösenden Fähigkeit. Ich experimentierte mit Staphylococcus albus und aureus, sowie mit einem Gemisch von Bacterium pyoceaneum und Staphylococcus aureus. Selbstverständlich durfte ich bei meinen Versuchen nur abgetötete Kulturen als Kontaktsubstanz benutzen. Den lokalen Kontrollversuch setzte ich mit der gleichen abgetöteten Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung an, die ich später zentrifugierte. Dabei zeigte der Staphylococcus albus nach kutaner Injektion einen nur schmalen Infiltrationsherd (daß der Stamm überhaupt für Meerschweinchen virulent war, zeigte die deutliche Abszeßbildung am gleichen Tier nach Injektion von lebender Kultur). Das Bakterien-

Kokken-Gemisch (Versuchsreihe VII) führte sogar nach ausgiebiger Erhitzung noch zu einer hämorrhagisch-eitrigen Entzündung. Diese Versuche mit Mikroorganismen erinnern an die Experimente von Gastreich (12), über die M. B. Schmidt (34) berichtete, sowie solche von Schley (33), ebenfalls aus dem Würzburger Institut, die auch mit Mikroorganismen und deren Toxinen Entzündungserscheinungen im Tierversuch auslösen konnten.

Zusammenfassend ergaben also diese Vorversuche zur lokalen Reaktion folgendes:

1. Das aktive in inaktive Meerschweinchenserum, am Meerschweinchen selbst injiziert, ist imstande, lokale Entzündungserscheinungen auszulösen.

2. Ein gesetzmäßiger Unterschied wesentlicher Art zwischen aktivem und inaktivem Serum war bisher nicht mit Sicherheit festzustellen.

3. Der Ausfall der Reaktion ist stärker, wenn die Versuchstiere bereits andere Entzündungserscheinungen aufweisen.

4. Auch die physiologische Kochsalzlösung führt bei parenteraler Injektion zu leukocytärer Reaktion des Gewebes, deren Stärke ebenfalls wieder abhängig ist von etwaigen anderen Entzündungserscheinungen am gleichen Tier.

5. Die einzelnen zur Gewinnung der Serotoxine notwendigen Kontaktsubstanzen zeigen wesentliche graduelle Unterschiede untereinander hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Entzündungserregung, wie im einzelnen näher ausgeführt wurde.

Ergebnisse der Hauptversuche.

Nach diesen unbedingt notwendigen Vorversuchen können wir uns nunmehr der Hauptfrage zuwenden: Lösen die Serotoxine eine Entzündung aus, und ist diese gleichartig mit der hyperergischen Entzündung? Es mußte also nach lokaler Injektion der Serotoxine eine Entzündung auftreten, die keine spezifischen gewebliehen Veränderungen gegenüber der einfachen Entzündung aufweist, sondern sich durch die Intensität des Ablaufes unterscheidet. Gerlach (14) hat die morphologischen Erscheinungen dieser Entzündung beim Meerschweinchen durch Experimente festgelegt. Er hat Meerschweinchen mit Pferdeserum sensibilisiert und dann die Erfolgsinjektion subkutan gegeben. Darauf sah er schon nach 15 Minuten ein teigiges Ödem auftreten, das sich rasch ausbreitete und auch mit mäßiger Rötung einherging. Nekrosen traten beim Meerschweinchen nur selten auf. Im mikroskopischen Bild herrschte die ödematöse Verquellung der Bindegewebsfasern und überhaupt eine ödematöse Lockerung des Gewebes vor. Daneben fand sich natürlich auch leukocytäre Exsudation.

Ich habe einen Versuch am Meerschweinchen auf der Grundlage der echten Anaphylaxie angesetzt und konnte Gerlachs Befund bestätigen. Einem mit einmaliger intraperitonealer Injektion von 2 ccm sterilen Pferdeserums schwach sensibilisiertem Meerschweinchen injizierte ich 0,1 ccm Pferdeserum nach 13 Tagen kutan. Schon nach ca. 15 Minuten war ein deutlich teigiges Ödem an der Injektionsstelle mit geringer Rötung der Umgebung festzustellen, das über die Impfstelle hinausgeht, sich aber nach einer halben Stunde nicht mehr wesentlich vergrößerte. Nach 2 Stunden war die Injektionsstelle etwas mehr verhärtet, das Ödem weniger deutlich teigig. Nach 24 Stunden tastete man ein relativ breites Infiltrat. Keine wesentliche Rötung war festzustellen, auch sah man nichts von Nekrosen; jedoch war die Umgebung gering ödematös. Mikroskopisch waren wie bei Gerlachs Versuchen die Fasern des kutanen Bindegewebes dick ödematös verquollen und auf der Muskulatur lag in einem ödematös gelockerten Gewebe in der Subkutis eine mäßig starke leukocytäre Infiltration. Bei einer ganz geringen Sensibilisierung erhielt ich also schon eine Entzündung mit den Kriterien der hyperergischen Entzündung. Waren demnach die

Serotoxine, d. h. die mit Kontaktsubstanz vorbehandelten Seren in der Lage, echte anaphylaktische Entzündung hervorzurufen, so müßte die kutane Injektion zum mindesten ähnliche Reaktionen auslösen. Daß Serotoxine entzündungserregend wirken, ist bekannt. Dold und Rados (8) haben darüber eine experimentelle Studie verfaßt; wie schon erwähnt, experimentierten sie aber nur am Auge und beurteilten auch nur makroskopisch ihre Befunde. Dabei konnten sie feststellen, daß bereits 15 Minuten nach der Injektion eine deutliche Rötung des Auges auftrat, die sich in der Folge zu einer schweren eitrigen Entzündung, manchmal bis zu einer Panophthalmie steigerte. Vergleichende Untersuchungen mit der echten anaphylaktischen Entzündung liegen von dieser Seite aber nicht vor. Der frühe Beginn der Entzündungserscheinungen, also die Rötung, könnte jedoch ein Symptom der hyperergischen Entzündung schon darstellen. Moro und Tomono (22) stellten im Rahmen einer Arbeit über das „anaphylaktische Gift" auch mit Serotoxinen einige Versuche an der Haut des Menschen an. Diese Versuche wurden im Jahre 1911, als die Kriterien der hyperergischen Entzündung noch nicht festgelegt waren (Roeßle 1914) veröffentlicht. Als Vergleichsuntersuchung zur hyperergischen Entzündung können sie daher nicht herangezogen werden, zumal keine Kontrollen vorliegen und auch nur makroskopische Beurteilung stattfand. Auch Friedberger demonstrierte schwerste entzündliche Veränderungen mit Nekrotisierung nach Injektion von Serotoixnen in das Gewebe des Ohres. Systematische Untersuchungen liegen aber auch von Seiten Friedbergers nicht vor.

Ich selbst habe nun an insgesamt neun hier verwerteten Versuchsserien, die mit allen Kontrollen und Vorsichtsmaßregeln durchgeführt wurden und die mit stets verschieden hergestellten Serotoxinen angesetzt waren, die Frage der serotoxischen Entzündung erneut aufgegriffen und die Reaktionen genau makroskopisch und besonders mikroskopisch an Serienschnitten (insgesamt von 36 Hautstellen) ausgewertet.*) Dabei habe ich besonders die Frage berücksichtigt, ob sich irgendwelche Erscheinungen feststellen ließen, welche die Entzündung durch Serotoxine auf die gleiche Stufe mit der hyperergischen Entzündung stellen konnten.

Im Folgenden kann ich die Resultate meiner vorher ausführlich geschilderten Versuche im Zusammenhang abhandeln.

Wie schon Moro und Tomono (22) an der Menschenhaut makroskopisch feststellten, sah auch ich an der Haut des Meerschweinchens nach Injektion von Serotoxinen entzündlich Infiltration. Eine halbe Stunde und zwei Stunden nach der kutanen Injektion waren aber an der Haut im Bereich der Impfstelle noch keine wesent-

*) Insgesamt benötigte ich dafür 90 Meerschweinchen. Die Untersuchungen konnte ich nur mit Unterstützung des „Nürnberger Sonderfonds" durchführen. An dieser Stelle meinen Dank dafür auszusprechen, ist mir angenehme Pflicht.

liche Rötung und sicher auch kein teigiges Ödem feststellbar. Erst im weiteren Verlauf entwickelte sich eine wechselnd große, meist aber engbegrenzte Infiltration, die man mehr mit dem Finger tasten, als mit dem Auge wahrnehmen konnte. Der Höhepunkt der Infiltration war etwa nach 24 Stunden festzustellen. Ödeme und stärkere Rötung waren aber auch dann nicht aufgetreten. Nekrosen sah ich nie. Mikroskopisch fand sich eine entzündliche Infiltration. In der Hauptsache bestand das Infiltrat aus polymorphkernigen, oxydasepositiven Leukocyten; Lymphocyten und Plasmazellen traten ganz zurück. Die bindegewebigen Elemente waren an der Reaktion nur schwach beteiligt. Manchmal sah man die Zellen der Adventitia etwas gebläht und vermehrt. Meist beschränkte sich diese Infiltration auf die Cutis bzw. Subkutis. Die angrenzenden Muskelinterstitien wiesen an der Hauptreaktionsstelle, also an der Impfstelle selbst, geringe Infiltrate auf. Das Epithel und das subepidermale Gewebe ließen nur Veränderungen erkennen, die durch die Depilation und den Einstich der Kanüle bei der Injektion hervorgerufen waren. Ödematöse Verquellung der Bindegewebsfasern, die auch nur annähernd so ausgeprägt waren, wie bei der hyperergischen Entzündung, fand sich nie. Niemals sah ich auch Nekrosen. Ich wechselte in jedem meiner Versuche die Versuchsanordnung. Weder die Art und Menge der Kontaktsubstanz*), noch auch die Dauer und die Methode der Digerierung ermöglichte es, die Seren so zu verändern, daß eine andersartige Entzündung eintrat. Es haben sich also bei der entzündlichen Reaktion auf die Injektion von Serotoxinen keine Kriterien nachweisen lassen, nach denen man berechtigt wäre, die Serotoxinentzündung mit der hyperergischen Entzündung auch nur annähernd gleichzusetzen. Auch die inaktivierten vorbehandelten Seren, die beim intravenösen Versuch serotoxinfrei waren, zeigten prinzipiell gleiche Entzündungserscheinungen.

Man mußte sich also die Frage vorlegen, ob die Vorbehandlung mit Kontaktsubstanzen überhaupt einen Einfluß auf die Entzündung ausübte. Die ausgedehnten Kontrollversuche ermöglichten mir, diese Frage zu bejahen. In allen meinen Hauptversuchen, auch in den mit inaktivierten vorbehandeltem Serum, sah ich eine stärkere Infiltration der Injektionsstelle als an den Bezirken, an denen nur unbehandeltes Serum injiziert worden war. Die Vorbehandlung mit Kontaktsubstanzen hat also sicher einen stärkeren Entzündungseffekt. Die einzelnen Entzündungsherde unterscheiden sich auch bei den einzelnen Entzündungsversuchen untereinander. Es war aber nun nicht so, daß dann eine stärkere Entzündung auftrat, wenn auch im intravenösen Versuch die anaphylaxieartigen Erscheinungen ausgeprägter waren: obwohl z. B. in der Versuchsreihe Nr. IX die

*) Auch dann nicht, wenn ich das Zentrifugat aus den vorbehandelten Seren lokal injizierte.

Krampfzustände am deutlichsten von allen vorhergehenden Versuchen waren, stand doch die lokale Reaktion weit hinter denen der Versuchsreihen II und VIII zurück. Es bestand also keine Korrelation zwischen intravenösem und kutanem Versuch. Während die Dauer der Digerierung und die Menge der Kontaktsubstanz, ebenfalls die Stärke der Entzündungserscheinungen nicht verändern, konnte ich doch erkennen, daß die Art der Kontaktsubstanz einen Einfluß auf den Ausfall der lokalen Reaktion hat. Es steht nach meinen Versuchen sicher fest, daß z. B. „Inulinsuspensionsseren" stärkere Entzündung hervorrufen, als die verschiedenartig vorbereiteten „Agarseren", daß die Erscheinungen des „Mikrobenserums" auffälliger waren, als die Reaktionen auf „Albusserum". Wenn man nun diese verschiedenen Ausfälle der Reaktion mit den unterschiedlichen Entzündungserscheinungen der Kontrollversuche vergleicht, die mit den Kontaktsubstanzen selbst auszulösen waren, so erhält man die Erklärung: Je stärker entzündungserregend die Kontaktsubstanz selbst schon ist, desto stärker ist auch der Reaktionsausfall bei den entsprechenden, mit der gleichen Kontaktsubstanz digerierten Seren.

Überblickt man diese Hauptversuche, so läßt sich somit zusammenfassend Folgendes feststellen:

1. Eine Übereinstimmung der Entzündungserscheinungen nach Injektion von Serotoxinen mit der hyperergischen Entzündung besteht nicht.

2. Der Reaktionsausfall, in Bezug auf die stärkere Infiltration, ist in den einzelnen Versuchen verschieden.

3. Dieser verschiedene Ausfall ist abhängig von der Art der Kontaktsubstanz.

4. Auch die Entzündung nach Injektion von Serotoxinen weist keine geweblich spezifischen Merkmale auf, sie ist als wechselnd starke unspezifische, manchmal schon eitrige Entzündung zu bezeichnen.

Diese Feststellungen sind wichtig für die allgemeine Frage der Beziehungen der Serotoxine zu der echten Anaphylaxie.

Wenn man nämlich durch die intravenösen Versuche die Angaben der Autoren über anaphylaxieartige Schockerscheinungen durch Injektion von Serotoxinen hat bestätigen können, so sollten die Versuche andererseits mit dazu beitragen, die Bedeutung der Serotoxine für das Problem der Anaphylaxie festzulegen. Würden die Serotoxine wirklich „das anaphylaktische Gift" darstellen, wie besonders Friedberger und seine Schule betont haben, so müßte dieses Gift auch lokal anaphylaktische Erscheinungen reproduzieren können; es müßten also Entzündungserscheinungen durch Serotoxine ausgelöst werden, die der hyperergischen Entzündung gleichen. Meine Unter-

suchungsergebnisse konnten dies aber nicht bestätigen. Es war lediglich eine mit wechselnd starker Emigration einhergehende Entzündung zu erzeugen, die sich auch nicht durch ihre Intensität von einer anderen unspezifischen Entzündung unterschied. Damit ist wohl ein weiterer Beweis erbracht, daß mit der Blutgiftung im Sinne der Serotoxine kein anaphylaktisches Gift erzeugt wird.

Es liegt nun die Versuchung nahe, daraufhin die Serotoxine prinzipiell vom Problem der Anaphylaxie auszuschalten. Das wäre meiner Ansicht nach zum mindesten verfrüht. Meine Versuche scheinen mir vielmehr weitere Anhaltspunkte und Hinweise für die physikalische Theorie des Anaphylaxieproblems zu geben; denn wie eingangs schon ausgeführt, konnte die Blutgiftung lediglich als physikalische Umstimmung des Serums aufgefaßt werden. Wenn also mit derartigem physikalisch verändertem Serum nach intravenöser Injektion ein anaphylaxieartiger Allgemeinschock eintrat, bei lokaler Injektion aber die anaphylaktische Entzündung ausbleibt, so könnte man doch als Erklärung für diesen Unterschied annehmen, daß das Schockgewebe der Lunge eine größere Empfindlichkeit bzw. Reaktionsbereitschaft auf kolloidal verändertes Serum aufweist, und daß im Gegensatz dazu der Bindegewebs-Gefäßapparat der Cutis für einen derartigen geringen Reiz insofern unterschwellig ist, als keine hyperergische Entzündung auftritt. Es wird also darauf ankommen, in weiteren Versuchen die Reaktionsbereitschaft des kutanen Gewebes zu erhöhen; derartige Versuche sind von mir in Gang gesetzt worden. Sie stützen sich im wesentlichen auf die Befunde Letterers (21) und Geißendörfers (13), die eine Allergie gegen art- und tiereigenes Serum erzeugen konnten.

Die Tatsache, daß ein Unterschied zwischen aktivem und inaktiviertem vorbehandeltem Serum im Ausfall des intravenösen Versuchs besteht, dagegen nach kutaner Injektion gleichartige Entzündungserscheinungen auftreten, zwingt auch nicht, die Serotoxine vom Problem der Anaphylaxie auszuschließen. Es war dadurch vielmehr wahrscheinlich, daß auch das Schockgewebe der Lunge nur dann reagiert, wenn die physikalische Umstimmung des injizierten Serums einen bestimmten Grad erreicht hat. Daß z. B. eine geringere Flokkung in dem inaktiviertem Serum zu erzielen ist als in dem aktivem Serum, haben die letzten Versuche von Dold (5 und 6) gezeigt. Überflüssig und überholt erscheint es mir, mit Dold und Rados (8) auf Grund der Tatsachen, daß auch inaktivierte vorbehandelte Seren überhaupt Entzündungserscheinungen auslösen, von den Serotoxinen thermostabile „Phlogistine" abzugrenzen. Ich glaube annehmen zu dürfen, daß die entzündungserregende Fähigkeit der vorbehandelten Seren ganz allgemein darauf beruht, daß einerseits durch die kolloidale Umstimmung und andererseits durch Auslaugung bzw. Lösung der Kontaktsubstanzen die Seren gewebsfremder werden, als die parenteral zugeführten unbehan-

delten Seren, und daß dadurch der kutane Bindegewebsgefäßapparat zu stärkerer Reaktion veranlaßt wird.

Diese Anschauung weist darauf hin, daß es für weitere Versuche, die sich mit der lokalen Reaktion beschäftigen, nicht gleichgültig ist, welche Art von Kontaktsubstanz zur Digerierung benutzt wird. Ich möchte auf Grund meiner Versuche die Vorbehandlung mit Agar, der in seiner Reaktion möglichst der H-Ionen-Konzentration des Gewebes angepaßt ist, am meisten empfehlen, wenn man nicht überhaupt auf Kontaktmittel verzichten will und das Serum lediglich physikalischen Einwirkungen (Schütteln etc.) aussetzt. Ein entsprechender Weg ist uns durch die letzten Versuche von Dold (5 und 6) gewiesen.

Zusammenfassung.

1. Es gelingt durch Vorbehandlung mit belebten und unbelebten Kontaktsubstanzen aktives Serum so zu verändern, daß sich im intravenösen Versuch anaphylaxieartige Erscheinungen auslösen lassen.

2. Auch ohne Kontaktsubstanzen können physikalische Veränderungen (Flockungen) eintreten, durch welche die Seren gleichartig toxisch werden.

3. Auch in verdünnten Seren ist nach Vorbehandlung eine Serotoxinbildung zu erzeugen.

4. Als ausschlaggebendes Kriterium der „Blutgiftung" wird nicht der akute Schocktod verwertet, sondern das differente Verhalten von aktivem und inaktiviertem vorbehandeltem Serum im intravenösen Versuch.

5. Aktives und inaktiviertes unbehandeltes Meerschweinchenserum lösen beim Meerschweinchen nach kutaner Injektion Entzündungsersheinungen aus.

6. Diese Entzündungen erscheinen stärker, wenn am gleichen Tier gleichzeitig stärkere entzündliche Reaktionen ablaufen. Das gleiche gilt für die durch physiologische Kochsalzlösung zu erzielende Gewebsreaktion.

7. Die Serotoxine lösen bei kutaner Injektion unspezifische Entzündungen aus.

8. Gleichartige Entzündungen treten auch nach lokaler Impfung mit inaktiviertem vorbehandeltem Serum auf.

9. Hyperergisch-anaphylaktische Entzündungen treten niemals auf.

10. Es wird somit ein weiterer Beweis erbracht, daß die Serotoxine nicht das „anaphylaktische Gift" sind.

11. Die durch kutane Injektion von vorbehandeltem Serum ausgelöste Entzündung beruht wohl einerseits auf der kolloidalen Veränderung des Serums, sowie auf einer gewissen Auslaugung bzw. Lösung der für sich allein schon entzündungserregenden Kontaktsubstanzen.

12. Es wird als einstweilen unberechtigt erachtet, die Serotoxine prinzipiell vom Problem der Anaphylaxie auszuschalten.

13. Der anscheinend gegensätzliche Reaktionsausfall zwischen intravenösem und kutanem Versuch wird auf eine verschiedene Reaktionsbereitschaft des Lungen-Gewebes zum kutanen Bindegewebsgefäßapparat gegenüber der Injektion physikalisch veränderter Seren bezogen.

Literaturverzeichnis.

(Nur die in der Veröffentlichung verwendete Literatur ist angeführt.)

1. Berger und Lang. Zur Histopathologie der idiosynkrasischen Entzündung in der menschlichen Haut. — Zieglers Beiträge, Bd. 87 (1931), S. 71.
2. Dale. Anaphylaxis and Immunity „in vitro". — Journal of Phys. Bd. 54, 1920—1921.
3. R. Doerr. Allergie und Anaphylaxie. — Handbuch d. path. Mikroorganismen. Kolle Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. I. c., S. 759.
4. R. Doerr. Empfindlichkeit und Überempfindlichkeit. — Arch. f. Derm. Bd. 150, 1926, S. 509.
5. H. Dold. Über die Entstehung anaphylatoxinartiger (serotoxinartiger) Eigenschaften im Serum durch Schütteln (Schüttelserotoxine). — Klin. Wochenschr. Bd. 5, 1926, S. 1281 u. S. 142.
6. H. Dold. Anaphylatoxin, charakterisiert durch eine eigenartige Flockungsphase der Serumglobuline. — Archiv f. Hygiene Bd. 89, 1919, S. 101.
7. H. Dold. Das Bakterien-Anaphylatoxin und seine Bedeutung für die Infektion. — Jena 1912.
8. Dold und Rados. Über entzündungserregende Stoffe im art- und körpereigenen Serum und Gewebssaft. — Arch. f. d. gesamte exper. Medizin Bd. 2, 1914, S. 192.
9. E. Friedberger. Über Anaphylaxie. — Ztschr. f. Immunität. Bd. 9, 1911, S. 369.
10. E. Friedberger. Diskussionsbemerkungen in der Berl. Mikrobiologischen Ges. v. 9. Jan. 1912. — Arch. f. Hagiene Bd. 89, Heft 1—3.
11. Friedemann. Weitere Untersuchungen über den Mechanismus der Anaphylaxie. — Ztschr. f. Imm. Bd. 2, 1909, S. 591.
12. Fr. Gastreich. Experimentelle Studien zur biologischen Analyse der Entzündungsvorgänge. — Langenbecksarchiv, Bd. 129, 1924, S. 621.
13. H. Geißendörfer. Über die Erzeugung geweblicher Überempfindlichkeit nach wiederholter Einspritzung arteigenen Blutes bei Meerschweinchen. — Virchow-Archiv, Bd. 285,2, 1932, S. 385.
14. Gerlach. Studien über hyperergische Entzündung. — Virchow-Archiv, Bd. 247,2, S. 294, 1923.
15. Gerlach. Über Beziehungen der Entzündung zum anaphylaktischen Zustand. — Centralblatt f. allg. Path. u. path. Anatomie, Ergänzungsheft 33. Verhandlungen der Deutschen Path. Gesellschaft, 1923.
16. Gerlach und Finkelday. Zur Frage mesenchymaler Reaktionen. — Krankheitsforschung 1927, Bd. 4.

17. S. Gräff. Das Verhalten der Leukocyten an Grenzflächen. — Verhandlungen der Deutsch. Path. Gesellsch. 1930.
18. Klinge. Experimentelle Untersuchungen über die gewebliche Überempfindlichkeit der Gelenke. — Verhandlungen der Deutsch. Path. Ges. 1929.
19. Lang (s. Berger und Lang).
20. M. Lerche. Enthaarungsversuche bei Impftieren. — Dtsch. tierärztliche Wochenschr. Bd. 28, 1920, S. 99.
21. E. Letterer. Versuche über Umstimmung der Gewebsreaktion nach wiederholter Injektion von arteigenem Eiweiß. — Verhandlungen der Path. Gesellsch. 1932, S. 199.
22. Moro und Tomono. Experimentelle Studien über anaphylaktisches Gift. — Ztschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 9, 1911, S. 581.
23. E. Nathan. Über Anaphylatoxinbildung durch Agar. — Ztschr. f. Imm., Bd. 17, 1913, S. 498.
24. E. Nathan. Anaphylatoxinbildung durch Inulin. — Ztschr. f. Imm., Bd. 23, 1915, S. 204.
25. E. Nathan (s. Friedberger Nr. 9).
26. E. Nathan. Ztschr. f. Imm., Bd. 1913, S. 478.
27. E. Nathan. Über Anaphylatoxinbildung durch Stärke. — Ztschr. f. Imm., Bd. 18, 1913, S. 636.
28. E. Nathan. Ztschr. f. Imm., Bd. 23, 1914, S. 204.
29. E. G. Novy und P. H. de Kruif. Anaphylatoxin and Anaphylaxis. II. Agaranaphylatoxin. — Journal of Infect. Diseases. Bd. 20, 1917, S. 536.
30. Roeßle. Über die Merkmale der Entzündung im allergischen Organismus. — Verhandlungen d. Path. Gesellsch. 1924.
31. Roeßle. Referat über Entzündung. — Verhandlungen der Path. Gesellsch. 1923.
32. Fr. Roulet. Über die granulomartige allergische Entzündung. — Verhandlungen d. Path. Gesellsch. 1931, S. 189.
33. W. Schley. Experimentelle Studien über die Reaktion des Körpers auf die Gasbrandinfektion. — Mitteilg. aus d. Grenzgebieten der Medizin u. Chirurgie. Bd. 41, 1929, S. 210.
34. M. B. Schmidt. Verhandlungen der Path. Gesellsch. 1924.
35. M. Schmidtmann. Diskussionsbemerkung zu Gräff. — Verh. d. Path. Ges. 1930, S. 142.
36. P. W. Schmidt. Die Eignung der Intracutanprobe zum Nachweis vasculärer Überempfindlichkeit der Haut. — Arch. f. Derm. Bd. 161, 1930, S. 152.
37. Schultz-Brauns. Die Vorteile des Gefrierschneidens unfixierter Gewebe für die histologische Technik. — Centralblatt für Allg. Path. u. Path. Anatomie, Bd. 1, 1931, Nr. 7, S. 271.

Buchdruckerei
Otto Tesch · Chemnitz
Hans Sachs Str. 36